



**İNSAN GCSF PROTEİNİNİN KOEKSPRESYON İLE ÇÖZÜNÜR FORMDA
ÜRETİLMESİ, SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

MUSTAFA SONGUR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

Prof. Dr. İSA GÖKÇE

Ocak - 2021

Her hakkı saklıdır.

T.C.
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ



İNSAN GCSF PROTEİNİNİN KOEKSPRESYON İLE ÇÖZÜNÜR FORMDA
ÜRETİLMESİ, SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

MUSTAFA SONGUR

TOKAT

Ocak - 2021

Her hakkı saklıdır.



Bu tez çalışması;

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından 2020/67 nolu proje ile desteklenmiştir.

MUSTAFA SONGUR Tarafından hazırlanan “İnsan GCSF Proteininin Koekspresyon İle Çözünür Formda Üretilmesi, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 25.01.2021 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği / Oy Çokluğu ile Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim dalında da Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman

Prof. Dr. İsa GÖKÇE

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi

.....

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Aykut ÖZGÜR

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi

.....

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Yakup ULUSU

Karamanoğlu Mehmet Bey Üniversitesi

.....

....

ONAY

.....

Prof. Dr. Mehmet Güneş

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

---/---/20--

TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

MUSTAFA SONGUR

20 Ocak 2021

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İNSAN GCSF PROTEİNİNİN KOEKSPEZYON İLE ÇÖZÜNÜR FORMDA ÜRETİLMESİ, SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

MUSTAFA SONGUR

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM
ENSTİTÜSÜ

BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR İSA GÖKÇE)

İnsan granülosit koloni uyarıcı faktör (GCSF) hematopoetik bir büyüme faktörü olup nötrofil yapımında ve farklılaşmasında önemli rol oynamaktadır. Klinikte oldukça önemli bir yere sahip olan GCSF, kemoterapiye bağlı nötropeni ve AIDS tedavisi gibi immün sistemin ihtiyaç duyduğu nötrofil seviyesine ulaşmasına yardımcı olması amacıyla kullanılmaktadır. GCSF gibi özellikle insan kökenli olan bazı yabancı biyomoleküller *Escherichia coli* (*E. coli*) ekspresyon sistemi ile ekspresyonu sırasında farklı etmenlerden dolayı bazen agregasyona uğrar ve inklüzyon cisimciği oluştururlar. Bu çok değerli moleküllerin geri kazanımı için çoğu zaman yeniden katlama (refolding) işlemleri uygulanır, fakat yine de kayda değer miktarda protein kullanılamaz halde kalır. Refolding işlemleri hem masraflı hem zaman alıcı hem de tam verimli etkiye sahip olmamaktadır. Bu nedenlerden dolayı, bu tez çalışmasında koekspresyon yöntemi ile şaperon proteinlerin kullanılması düşünülmüştür. Bu kapsamda beş şaperon plazmit sistemi kullanılarak (pG-KJE8, pGro7, pKJE7, pG-Tf2, pTf16) GCSF'nin çözünür formda üretimi sağlanmaya çalışılmıştır. Yapılan deneyler sonucunda pKJE7 plazmidinin GCSF'yi çözünür formda elde etmede daha etkili olduğu bulunmuştur. Bu sistem ile koeksprese edilen GCSF proteini afinite kromatografisiyle yüksek saflıkta elde edilmiş ve insan göbek bağı endotel hücreleri (HUVEC) üzerindeki proliferatif aktivitesi ortaya koyulmuştur. Sonuç olarak, daha önce *E. coli* ekspresyon sisteminde inklüzyon cisimciği olarak çöken GCSF, şaperon proteinler ile koekspresyon neticesinde doğru şekilde katlanarak, işlevsel ve saf olarak elde edilmiştir.

2021, 53 SAYFA

ANAHTAR KELİMELELER: Granülosit koloni uyarıcı faktör (GCSF), Koekspresyon, Rekombinant protein, Biyoteknoloji

ABSTRACT

MASTER THESIS

PRODUCTION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF HUMAN GCSF PROTEIN IN SOLUBLE FORM WITH CO-EXPRESSION

MUSTAFA SONGUR

TOKAT GAZIOSMANPASA UNIVERSITY INSTITUTE OF

DEPARTMENT OF BIOENGINEERING

(SUPERVISOR: PROF. DR. İSA GÖKÇE)

Human granulocyte colony stimulating factor (GCSF) is a hematopoietic growth factor and plays a crucial role in neutrophil production and differentiation. GCSF, which has a very important place in the clinic, is used to help the immune system up to the level of neutrophils required by the immune system, such as chemotherapy-induced neutropenia and AIDS treatment. Some foreign biomolecules, especially of human origin, such as GCSF, sometimes aggregate because of different factors during expression and creates inclusion bodies in *E.coli* expression system. Refolding process is often used to recover these very valuable molecules, but still significant amounts of protein remain unusable. Refolding processes are both costly, time consuming and not fully efficient. For these reasons, the use of chaperone proteins by co-expression method has been considered in this thesis study. In this context, using five chaperone plasmid systems (pG-KJE8, pGro7, pKJE7, pG-Tf2, pTf16) it has been tried to produce GCSF in soluble form. As a result of the experiments, it was found that pKJE7 plasmid is more effective in obtaining GCSF in soluble form. GCSF protein co-expressed with this system was obtained in high purity by affinity chromatography and its proliferative activity on human umbilical cord endothelial cells (HUVEC) was demonstrated. As a result, GCSF, which previously aggregated as an inclusion body in the *E. coli* expression system, was correctly folded by co-expression with chaperone proteins and was obtained as functional and pure.

2021, 53 PAGE

KEYWORDS: Granulocyte colony stimulating factor (GCSF), Co-expression, Recombinant protein, Biotechnology

ÖNSÖZ

Lisans ve Yüksek Lisans eğitimim boyunca gösterdiği bilimsel ve etik çizgiler ile yoluma ışık tutan ve çalışmalarımı gerçekleştirdiğim laboratuvar imkanı sunan saygıdeğer hocam Prof. Dr. İsa GÖKÇE'ye, hücre kültürü çalışmalarında laboratuvar imkanlarını ve desteklerini esirgemeyen hocam Dr. Öğr. Üyesi Seçil ERDEN TAYHAN hocama, çalışmalarımda fikrine ihtiyaç duyduğumda yardıma koşan hocam Dr. Öğr. Üyesi Sema BİLGİN hocama teşekkür ederim.

Tokat Gaziosmapaşa Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Biyomühendislik Bölümü Rekombinant Protein Laboratuvarı ekip arkadaşlarıma ve bilhassa tez çalışmam boyunca emeğini asla inkâr edemeyeceğim Arş. Gör. Özlem KAPLAN ve Arş. Gör. Rizvan İMAMOĞLU'na teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasını destekleyen Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı'na (Proje No: 2020/67) teşekkürlerimi sunarım.

Çocukluğumdan bu yana her daim maddi ve manevi yanımda olan, yanında büyüdüğüm ve hayattaki en değerli varlığım, tüm başarılarımı adadığım Babaannem Safiye SONGUR başta olmak üzere tüm aileme teşekkür ederim.

Mustafa SONGUR

20 Ocak 2021

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
ÇİZELGE LİSTESİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ/KURAMSAL TEMELLER/GENEL BİLGİLER	3
2.1. Biyoteknoloji	3
2.2. Rekombinant DNA Teknolojisi	5
2.3. Hematopoetik Büyüme Faktörleri	7
2.4. Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör (GCSF)	9
2.5. İnklüzyon Cisimcikleri ve Protein Agregasyonu	12
2.6. Şaperon Sistemler ve Koekspresyon	12
3. MATERYAL VE YÖNTEM	18
3.1. Materyal	18
3.1.1. Kullanılan Cihazlar	18
3.1.2. Kullanılan Kimyasallar	19
3.1.3. Kullanılan Çözeltiler	20
3.2. Yöntem	22
3.2.1. Rekombinant GCSF'nin Üretilmesi ve Saflaştırılması	22
3.2.2. Rekombinant GCSF' nin Aktivite Tayini	30
4. BULGULAR	34
4.1. Rekombinant Protein Üretimine Ait Bulgular	34
4.2. Hücre Canlılık Testlerine Ait Bulgular	42
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	44
6. KAYNAKÇA	48
7. ÖZGEÇMİŞ	53

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler	Açıklama
bç	Baz çifti
g	Gram
mg	Miligram
mL	Mililitre
μM	Mikromolar
M	Molar
mM	Milimolar
nm	Nanometre
rpm	Dakikadaki devir sayısı (rotatory per minute)
°C	Celcius olarak sıcaklık derecesi
Ng	Nanogram
μl	Mikrolitre

Kısaltmalar	Açıklama
Amp	Amfisilin
APS	Amonyumpersülfat
Chl	Kloramfenikol
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
IB	İnklüzyon cisimciği
IPTG	İzopropil β -D-1 tiyogalaktopiranozid
LB	Luria-Bertani besiyeri
MTT	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
O.D	Optik yoğunluk
PBS	Fosfat tuz tampon
PCR	Polimeraz zincir (chain) reaksiyonu
PMSF	Fenil metil sülfonil florit
RNA	Ribonükleik asit
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS PAGE	SDS poliakrilamid jel elektroforezi

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Rekombinant DNA'dan protein üretimi.....	6
Şekil 2.2. Hematopoez ile kan hücrelerinin üretimi.....	8
Şekil 2.3. GCSF' nin yapısı.....	10
Şekil 2.4. GCSF' nin immün fonksiyonlar üzerindeki etkileri.....	11
Şekil 2.5. Agregasyonun şematik gösterimi.....	13
Şekil 2.6. PKJE7 plazmit sistemi.....	16
Şekil 3.1. pTolT plazmit vektör sisteminin poli-linker bölgesinin detaylı restriksiyon enzimleri ile birlikte verilen dna dizisi.....	24
Şekil 4.1. GCSF'nin pG-KJE8 plazmidi ile koekspresyonu sonucu SDS-PAGE görüntüsü.....	34
Şekil 4.2. GCSF'nin pGro7 plazmidi ile koekspresyonu sonucu SDS-PAGE görüntüsü.....	35
Şekil 4.3. GCSF'nin PKJE7 plazmidi ile koekspresyonu sonucu SDS-PAGE görüntüsü.....	36
Şekil 4.4. GCSF'nin pg-tf2 plazmidi ile koekspresyonu sonucu SDS-PAGE görüntüsü.....	37
Şekil 4.5. GCSF'nin ptf16 plazmidi ile koekspresyonu sonucu SDS-PAGE görüntüsü.....	38
Şekil 4.6. GCSF'nin şaperon plazmit ile koekspresyonu olmadan TOLAIİİ füzyonu ile ekspresyonu.....	39
Şekil 4.7. GCSF'nin PKJE7 plazmidi ile koekspresyonunun büyük ölçekte üretimine ait SDS-PAGE görüntüsü.....	40
Şekil 4.8. GCSF'nin PKJE7 plazmidi ile koekspresyonu sonrası ek saflaştırma işlemlerine ait SDS-PAGE görüntüsü.....	41

Şekil 4.9. HUVEC hücre hattında GCSF'nin 24 saat sonrası aktivite tayinine ait % canlılık grafiği	42
Şekil 4.10. HUVEC hücre hattında GCSF'nin 48 saat sonrası aktivite tayinine ait % canlılık grafiği	43
Şekil 5.1. Farklı rhG-CSF konsantrasyonlarının HUVEC hücre hattında 24 ve 48 saat sonu % canlılık analizi.....	46
Şekil 5.2. rhG-CSF ve VEGF'in HUVEC proliferasyon analizi.	47



ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge

Sayfa

Çizelge 2.1. Takara firmasına ait farklı şaperonların sentezinden sorumlu ticari plazmit vektörler.....	15
Çizelge 3.1. Tez çalışmalarında kullanılan cihazlar	18
Çizelge 3.2. Tez çalışmalarında kullanılan kimyasal ve gereçler.....	19
Çizelge 3.3. Plazmit DNA saflaştırma prosedürü.....	25

1. GİRİŞ

Rekombinant DNA teknolojisi günümüzde oldukça yaygın olarak kullanılan ve gelecek vaat eden bir bilim dalıdır. Temel olarak restriksiyon endonükleaz enziminin keşfi ile başlayıp günümüze kadar uzanmış ve kullanım alanı yaygınlaşmıştır. Rekombinant DNA teknolojisi sayesinde günümüzde pek çok alanda kolaylık sağlanmıştır. Rekombinant DNA teknolojisi, çağımızın endüstriden tarıma, tıp alanından gıdaya kadar geniş bir yelpazede ihtiyaç duyduğu pek çok gereksinimi karşılamakta kullanılmaktadır.

Büyüme faktörleri vücudumuzda farklı işlevlerden sorumlu ve oldukça önemli fonksiyonlara sahip biyomoleküllerdir. Hücrelerin büyümesinden çoğalmasına, farklılaşmasından onarımına ve hatta göçüne kadar pek çok olayda rol oynamaktadır. Granülosit koloni uyarıcı faktör (GCSF) insan fibroblast hücrelerinde, makrofajlarda, ilik stroma hücreleri ve endotel hücrelerinde doğal olarak veya Rekombinant DNA teknolojisi ile laboratuvarında üretilen granülosit öncü hücrelerinin çoğalmasını ve olgunlaşmasını uyaran bir büyüme faktörüdür. GCSF, nötrofil yapımını stimüle ederek hem kemoterapiye bağlı nötropeniye, hem de diğer nötropenik rahatsızlıkları gidermek için klinikte yaygın olarak kullanılmaktadır. Hayvan modelleri üzerinde yapılan *in vitro* ve *in vivo* araştırmaların etkileri, bu sitokinin fagositozda görev alan granülosit hücrelerinin büyümesi ve farklılaşmasını sağladığı daha önceki çalışmalarda yayımlanmıştır (Aktaş, 1996).

Rekombinant olarak üretilen biyo-aktif bileşenlerin saflaştırılması sırasında bazı zorluklar meydana gelebilmektedir. Bunlardan en çok karşılaşılanı biyomolekülün inklüzyon cisimciği olarak agregasyona uğramasıdır. Bu sorun daha pek çok sorunu beraberinde getirebilmekte ve saflaştırma sürecini sekteye uğratabilmektedir. Oldukça sık karşılaşılan bu durum karşısında bazı yöntemler sayesinde giderilmektedir. Bu yöntemlerden en çok bilineni rekombinant ürünün kimyasal çözeltiler ile refolding işlemlerine tabi tutularak yeniden katlanıp üç boyutlu yapısının kazanımı hedeflenmektedir. Fakat bu işlem sonrasında hala doğru katlanamayan hedef ürün kaldığı daha önceki çalışmalarda saptanmıştır (Vallejo ve Rinas, 2004).

Konakçı hücrelerde rekombinant proteinlerin aşırı üretimi genellikle ürünlerin yanlış katlanmasına ve agregasyona uğramasına yol açar. Rekombinant proteinlerin çözülebilir formda üretilmesi adına daha önce pek çok çalışma yapılmış, fakat bu hedefe en yakın sonuçlar şaperon proteinler ile koekspresyon sistemi ile elde edilmiştir. Şaperonlar, yeni sentezlenen proteinlerin doğal duruma katlanmasına yardımcı olarak yanlış katlanmış ve kümelenmiş proteinleri yeniden katlayan bir kalite kontrol sistemi sağlamaktadır. *E. coli* sitoplazmasında, yeni sentezlenen proteinlerin katlanması ribozomla ilişkili trigger faktör, DnaK sistemi (DnaJ ve GrpE ko-şaperonları ile DnaK sistemi (DnaJ ve GrpE ko-şaperonları ile DnaK; KJE) ve GroEL sistemi (GroES ko-şaperonlu GroEL; ELS) tarafından desteklenir (de Marco ve ark., 2007).

Bu tez çalışması anemi, lösemi, talasemi, trombositopeni ve kemoterapiden kaynaklı nötropeni gibi hastalıklarda klinikte sıklıkla kullanılan rekombinant GCSF (Granülosit koloni uyarıcı faktör)'nin koekspresyon sistemi ile çözülebilir formda üretilerek saflaştırılmasını, karakterizasyonunu ve hücre kültürü çalışmalarını içermektedir. Tez çalışması için koekspresyon vektörleri ticari olarak temin edilmiş, önceki çalışmalarda inklüzyon cisimciği olarak agregasyona uğrayan rekombinant GCSF'nin çözülebilir formda elde edilerek saflaştırılması sağlanmış karakterizasyonu belirlenmiş, HUVEC hücre hattı ile yapılan hücre kültürü çalışmaları ile hücre proliferasyonunu arttırmaya, yönelik katkısı ve negatif kontrole göre verimi analiz edilmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ/KURAMSAL TEMELLER/GENEL BİLGİLER

2.1. Biyoteknoloji

Biyoteknoloji; biyosistemler kullanılarak ekonomik değeri yüksek olan çıktıların elde edilmesi amaçlandığı bir bilim dalıdır. Son zamanlarda özellikle genetik biliminin gelişmesiyle birlikte bir organizmadan diğerine genetik materyallerin transferi ve endüstriyel öneme haiz yeni ürünlerin üretiminin optimizasyonu için elverişli organizmaların varlığı biyoteknolojik uygulamalara hız kazandırmıştır (Gül, 2014).

"Biyoteknoloji" bilimi diğer bilimlere göre nispeten yeni olmakla beraber biyoteknoloji uygulamaları neredeyse medeniyetin başlangıcı kadar eskidir. İnsanlar, seçilmiş bitki ve hayvanların kontrollü üreme yoluyla gıda ürünleri ve evcil hayvanlar üretmeyi öğrenene kadar medeniyet gelişmemiştir. Yirminci yüzyıla gelindiğinde ise biyoteknoloji sayesinde organizmaların bazı özellikleri değiştirilmeye başlanmıştır. Dikkatle kontrol edilen ıslah programları sayesinde, mahsullerin bitki mimarisi ve meyve özellikleri, mekanik hasadı kolaylaştırmak için değiştirilmiştir. Bitkiler, belirli ilaçlar veya baharatlar üretmek için geliştirilmiş ve penisilin veya diğer yararlı tıbbi ve gıda ürünleri gibi antibiyotikler üretmek için mikroorganizmalar seçilmiştir (Crawford, 1983).

Biyoteknolojinin gelişiminde önemli yere sahip tarihler ise şu şekilde sıralanabilir;

-1863, Mendel, bezelye bitkisi üzerindeki çalışmalarıyla canlılardaki karakteristik özelliklerin nesilden nesile iletildiğini belirleyerek, genetik biliminin temelini oluşturmuştur.

-1900, Drosophila, ilk gen araştırma çalışmalarında kullanılmıştır.

-1906, Genetik terimi tanımlanmıştır.

-1919, Biyoteknoloji terimi, ilk kez bir Macar Mühendis tarafından kullanılmıştır.

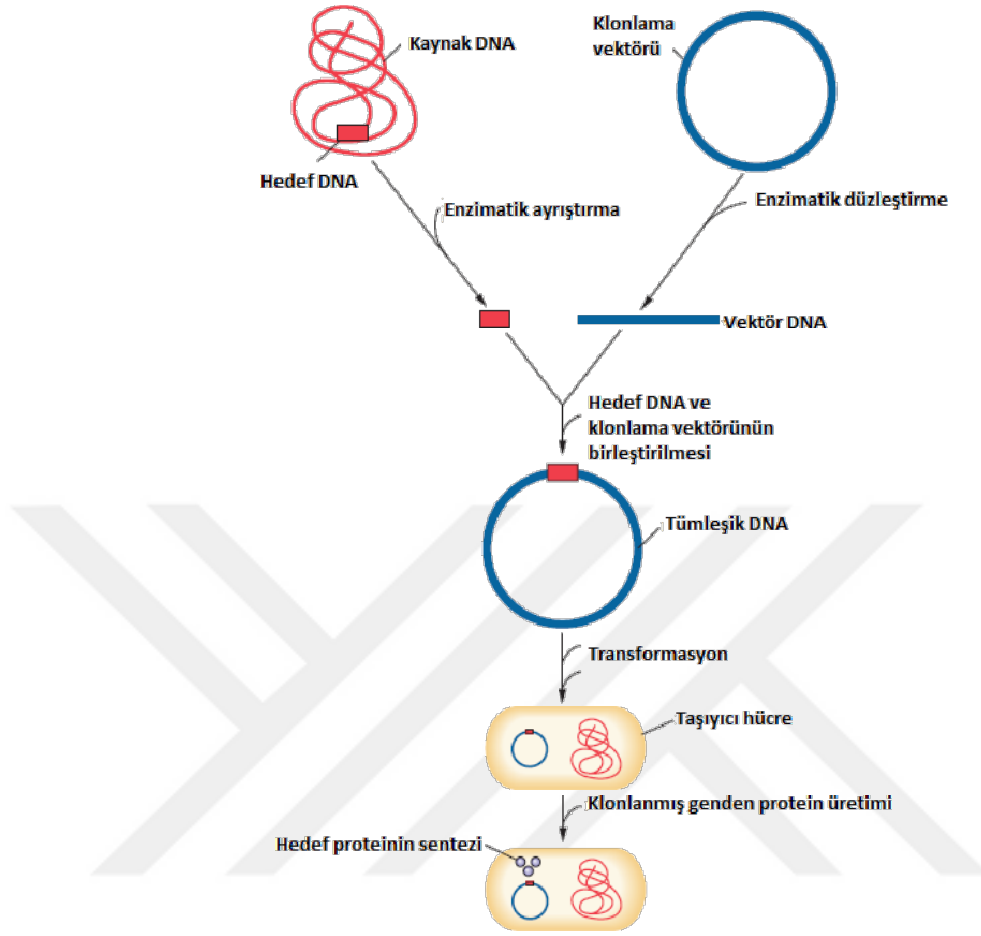
-1928, Aleksander Fleming ilk antibiyotik olan Penisilin'i keşfetmiştir.

- 1938, Moleküler Biyoloji terimi tanımlanmıştır.
- 1940, Oswald Avery, genlerin yapıtaşını DNA'nın oluşturduğunu bulunmuştur.
- 1941, Genetik Mühendisliği terimi Danimarkalı A. Jost tarafından kullanılmıştır.
- 1946, İlk genetik rekombinasyon örneği gerçekleştirilmiştir.
- 1953, James Watson ve Francis Crick DNA molekülünün çift sarmal yapısını keşfetmiştir.
- 1970, Smith, Wilcon ve Kelly restriksiyon enzimlerini keşfetmiştir.
- 1973, Boyer ve Kohen *E. coli* 'de ilk gen naklini gerçekleştirmiştir.
- 1980, DNA'nın kopyalanarak çoğaltılması sağlanmıştır (PCR tekniği).
- 1983, Monsanto ve Agrigenetics şirketleri bitki üretiminde ilk gen naklini gerçekleştirmiş ve böylece transgenik bitkiler hayatımıza girmiştir.
- 1994, ABD'de Calgene tarafından ilk olarak ticari transgenik bitki "Flavr savr domates" piyasaya sürülmüştür.
- 1996, Biyosensörlerin kullanılmasına başlanmıştır.
- 1997 Doly'nin klonlanması gerçekleştirilmiştir.
- 1998, Embriyonik kök hücre çalışmaları yapılmıştır.
- 1999, Deli dana hastalığı için hızlı ve güvenilir teşhis sistemi geliştirilmesi sağlanmıştır.
- 2001: 200,000 çalışan, devlete ait \$30 milyar gelir, toplam 1450 şirket kurulmuştur (350'si kamu şirketi) (Anonim a, 2020).

2.2. Rekombinant DNA Teknolojisi

Rekombinant DNA teknolojisi, normal şartlarda hedeflenen bir ürünü üretemeyen bir organizmaya genetik mühendisliği teknikleri ile belirlenen bir amaç doğrultusunda gen manipülasyonu sayesinde bazı özellikler kazandırma prensibine dayanan bir alandır. Bu teknoloji günümüzde pek çok ürünün üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Rekombinant DNA teknolojisinin temeli “Rekombinasyon” işlemine dayanır. Rekombinasyon, farklı donörlerden alınan genetik materyalin eşlenerek yeni bir gen dizisi oluşturması olayıdır. Rekombinasyonun amacı temelde çeşitlilik oluşturmaktır. Şekil 2.1.’de Rekombinant DNA teknolojisi ile protein üretim şeması basitçe gösterilmiştir.

Rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak, Genentech tarafından *Escherichia coli* 'de insan insülin hormonu üretilmiştir ve 1981'de Eli Lilly Company tarafından patenti alınmıştır. Bundan önce, Tip 1 diyabet hastaları, insan formundan tamamen farklı bir organik bileşiğe sahip olan domuz pankreasından izole edilmiş insülin kullanmak zorunda kalmaktaydı. 1981'den sonra hastalar insan kaynaklı insülin hormonu kullanmaya başlamışlardı. Ardından insan proteini kullanarak hastalıkların tedavisinde yeni bir çağ atlandı. Bu terapötik proteinlerin üretimi, hem ürün saflığı hem de miktarı gibi pek çok konuda avantaj sağlamıştır (Hu, 2018).



Şekil 2.1. Rekombinant DNA'dan protein üretimi (Glick, 2010-modifiye edilmiştir).

Rekombinant DNA teknolojisi 3 ana basamak şeklinde sıralanabilir.

1.Basamak Rekombinant DNA teknolojisi (rDNA teknolojisi), ilgilenilen genin (yabancı DNA) izolasyonu ile başlar. Gen daha sonra bir vektöre eklenir ve klonlanır. Bir vektör, bağımsız büyüme yeteneğine sahip bir DNA parçasıdır. Yaygın olarak kullanılan vektörler, bakteriyel plazmitler ve viral fajlardır. İlgilenilen gen, plazmide entegre edilmiştir (Bir plazmit, bir kromozomal DNA'dan fiziksel olarak ayrılmış ve bağımsız olarak replike olabilen bir hücre içindeki küçük bir DNA molekülüdür. En çok bakterilerde küçük, dairesel, çift sarmallı DNA molekülleri olarak bulunurlar; bununla birlikte, plazmitler bazen arkelerde ve ökaryotik organizmalarda bulunur) veya fajda (Bir faj veya bakteriyofaj, bir bakteriyi enfekte eden ve çoğaltan bir virüstür.

Bakteriyofajlar, bir DNA veya RNA genomunu kapsülleyen proteinlerden oluşur ve nispeten basit veya ayrıntılı yapılara sahip olabilir. Genomları en az dört geni ve yüzlerce geni kodlayabilir. Fajlar, genomlarının rDNA olarak adlandırılan sitoplazmasına enjekte edildikten sonra bakteri içinde çoğalır.

2.Basamak Yabancı DNA'yı içeren vektörü, proteini ifade etmek için konakçı hücelere sokmadan önce klonlanması gerekir. DNA'nın çok sayıda kopyasını üretmek için klonlama gereklidir. Çünkü izole edilen genetik materyal genelde konakçı hücelere girmek için yetersizdir.

3.Basamak Vektör büyük miktarlarda izole edildikten sonra, memeli, maya veya özel bakteri hücreleri gibi istenen konakçı hücelere sokulabilir. Konakçı hücreler daha sonra yabancı proteini rDNA'dan sentezleyecektir. Hücreler büyük miktarlarda büyüdüğünde, yabancı veya rekombinant protein izole edilebilir ve büyük miktarda saflaştırılabilir (Khan, 2020).

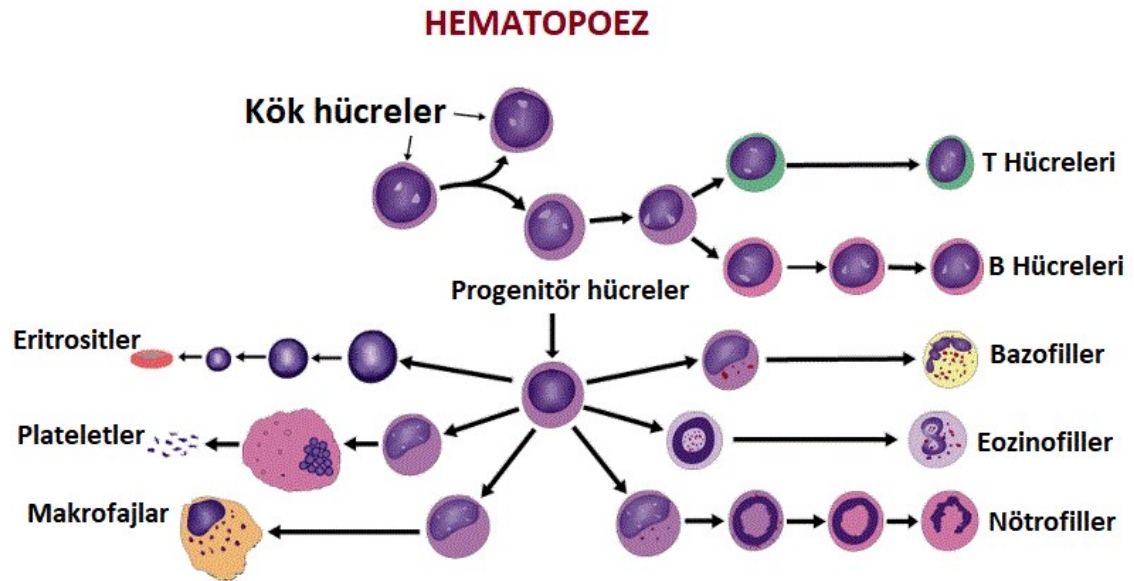
Klinikte ise rekombinant proteinlerin bir kısmı olan rekombinant hormonlar, interferonlar, interlökinler, büyüme faktörleri, tümör nekroz faktörleri, kan pıhtılaşma faktörleri, trombolitik ilaçlar yaygın olarak diyabet, cücelik, miyokard enfarktüsü, konjestif kalp yetmezliği, serebral apopleksi multipl skleroz, nötropeni, trombositopeni, anemi, hepatit, romatoid artrit, astım, Crohn hastalığı ve kanser gibi başlıca hastalıkları tedavi etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Pham, 2018).

2.3. Hematopoetik Büyüme Faktörleri

Hematopoetik büyüme faktörleri; Hematopoezin regülasyonundan sorumlu biyomoleküllerdir ve beyaz kan hücresi yapımını uyararak onların farklılaşmasını ve çoğalmasını sağlar (Şekil 2.2). Hematopoetik büyüme faktörlerinin bazıları koloni uyarıcı faktör (colony stimulating factor, CSF), eritropoetin (erythropoetin, EPO) ve kök hücre faktörü (stem cell factor, SCF) gibi başlıca büyüme faktörleridir (Aktaş, 1996). Tüm hematopoetik büyüme faktörleri pluripotent hücrelerden köken almaktadır. Plüripotent kök hücrelerin kendini yenileme ve farklılaşma özellikleri vardır (Slukvin, 2013).

Kırmızı kan hücrelerinin üretimi için, Hemopoietin adı verilen ilk hematopoietik humoral regülatör 1906'da tanımlanmıştır. Daha sonra Eritropoetin (EPO) adını almıştır (Jelkmann, 2007). Fakat, insan EPO'sunun saflaştırılması 1977 yılında gerçekleştirilmiştir. Pluripotent hematopoietik kök hücrelerden türetilen hematopoietik progenitörlerin proliferasyonunun ve farklılaşmasının hiyerarşik bir görünümü geliştirilmiş ve koloni uyarıcı faktörler (CSF'ler) dahil olmak üzere hematopoietik büyüme faktörlerinin yetenekleri, yarı katı kültürde hematopoietik koloni oluşumlarının *in vitro* biyo analizi ile doğrulanmıştır. Ardından ise reseptörleri ve moleküler tanımlamaları yapılmıştır (Metcalf, 2008).

Klinik çalışmalarda GCSF'nin nötrofil kemotaksisini ve fagositozu arttırdığı, “respiratory burst” mekanizmasını uyardığı, bakterisidal ve fungusidal aktiviteyi, antikora bağlı hücre toksisitesini (ADCC) arttırdığı saptanmıştır (Dale ve ark., 1995).



Şekil 2.2. Hematopoez ile kan hücrelerinin üretimi (Anonim b-modifiye edilmiştir).

2.4. Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör (GCSF)

Kemoterapi, çoğu kanser hastasında etkin şekilde tedavi amaçlı kullanılan bir tedavi biçimidir. Birçok kemoterapi ilacı yan etki olarak enfeksiyonla savaşan bağışıklık hücrelerinin tahrip edilmesi veya etkisizleştirilmesine yol açmaktadır. Bu hücreler beyaz kan hücreleri, nötrofiller veya granülositler olarak bilinir. Nötropeni, granülosit (enfeksiyonla savaşan hücreler) eksikliği anlamına gelmektedir. Bağışıklık sistemi yeterli derecede çalışmayan bu hastalar enfeksiyona karşı savunmasız kalabilmektedir. Nötropeni durumunda enfeksiyona karşı hastanede antibiyotiklerle yoğun bir tedavi gerekli olabilmektedir.

Bilim insanları tarafından vücudu daha fazla granülosit üretmeye teşvik eden 174 aminoasit büyüklüğünde olan bir protein türü olan granülosit koloni uyarıcı faktör (GCSF) adı verilen keşfedilmiştir. Bu buluştan sonra nötropeniye neden olabilecek bazı kemoterapi türleri ile birlikte GCSF ilaçları vermek standart bir uygulama haline gelmiştir. Bu protein ayrıca kemik iliği veya kök hücre nakli parçası olarak veya bazı komplikasyonları tedavi etmek için verilebilmektedir (Anonim c, 2020).

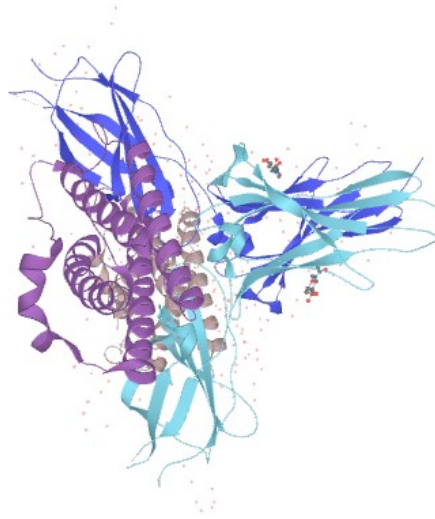
Granülosit koloni uyarıcı faktör (GCSF), kemik iliğinde nötrofil üretimini uyaran ve olgun nötrofillerin hücresel işlevlerini düzenleyen bir sitokindir. Nötrofiller ve öncülerinin yanı sıra monositler, GCSF etkisinin doğrudan hedef hücreleridir. GCSF, monosit fonksiyonlarını anti-inflamatuar bir şekilde etkiler: Monositlerin GCSF ile uyarılması, LPS'in neden olduğu IL-1b, TNF-a, IL-12 ve IL-18 salımının zayıflamasıyla sonuçlanmaktadır. Bu da GCSF'nin anti-inflamatuar özellik göstermesini sağlamaktadır (Boneberg ve Hartung, 2002). GCSF ve GM-CSF, granülositlerin veya ASH'lerin üretimini teşvik etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. ABD Gıda ve İlaç İdaresi, konjenital ve edinsel nötropenilerin tedavisi ve kök hücre nakli için periferik hematopoetik progenitör hücrelerin mobilizasyonu için polietilen glikol (PEG) ile modifiye edilmiş GCSF'i (Filgrastim) onaylamıştır (Mehta ve ark., 2015).

Dolaşan tüm kan hücreleri, kemik iliğinde bulunan farklılaşmamış hematopoietik öncü hücre kökenlidir ve her bir olgun hücre tipi, farklı özel işlevlere ve farklı yaşam sürelerine sahiptir. Yeterli sayıda dolaşımdaki kan hücrelerini sabitlemek adına, kayıp

hızlarına eşit bir hızda temin edilmelidir. Normal yaşam süreçleri yoluyla kaybı gidermek için bir insanda günlük yaklaşık 5×10^{11} myeloid hücresinin üretilmesi gerekmektedir (Schneider ve ark., 2004). Bu görev, kemik iliğinde bulunan pluripotent hematopoietik kök hücreler tarafından yürütülür ve karmaşık bir büyüme faktörleri ağı ve hücre dışı mikro ortam tarafından düzenlenmektedir. Bu büyüme faktörlerinden biri GCSF'dir.

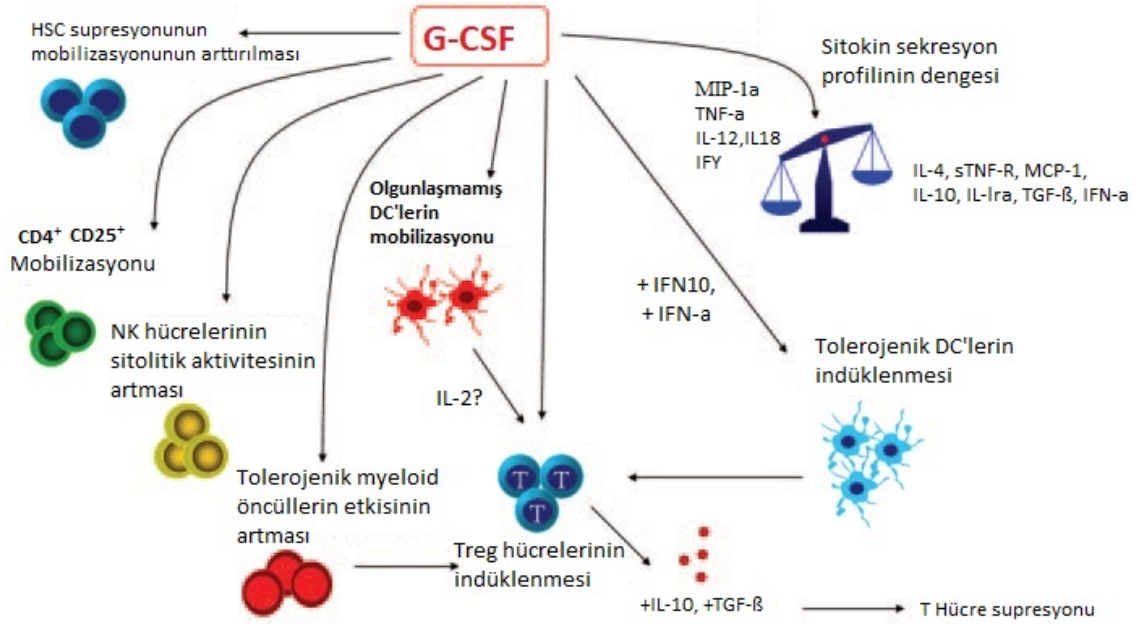
GCSF'nin hematopoetik etkileri temel olarak nötrofil hücreleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Kemirgenlerle yapılan deneylerde, GCSF enjeksiyonu, kemik iliğinde nötrofil üretimini artırarak ve daha az olgun formların dolaşıma salınmasını hızlandırarak nötrofili ile sonuçlanmıştır (Wingfield ve ark., 1988). Buradan yola çıkarak insanlarda GCSF tedavisinin, belirgin bir iyileşme ve hafif bir monositoz ve lenfositoz nötrofili ile sonuçlandığı sonucuna ulaşılabilmektedir.

İnsan GCSF proteini klinikte yaygın olarak Filgrastim (*E. coli*'de üretilen glikozillenmemiş GCSF) (Şekil 2.3.) ve Lenograstim (Çin hamsteri ovaryum hücresi kökenli glikozillenmiş GCSF) adıyla yaygın olarak kullanılmaktadır.



Şekil 2. 3. GCSF' nin yapısı (<https://www.uniprot.org/uniprot/P09919>,2021)

G-CSF periferik kandaki nötrofil sayısını hızlı ve yeter miktarda arttırarak bağışıklık sistemine önemli katkıda bulunmaktadır. G-CSF'nin humoral immün sisteme katkıları bununla sınırlı olmamakla beraber daha pek çok görevde rol oynamaktadır (Şekil 2.4.).



Şekil 2. 4. G-CSF' nin immün fonksiyonlar üzerindeki etkileri (Rutella ve ark., 2005-modifiye edilmiştir).

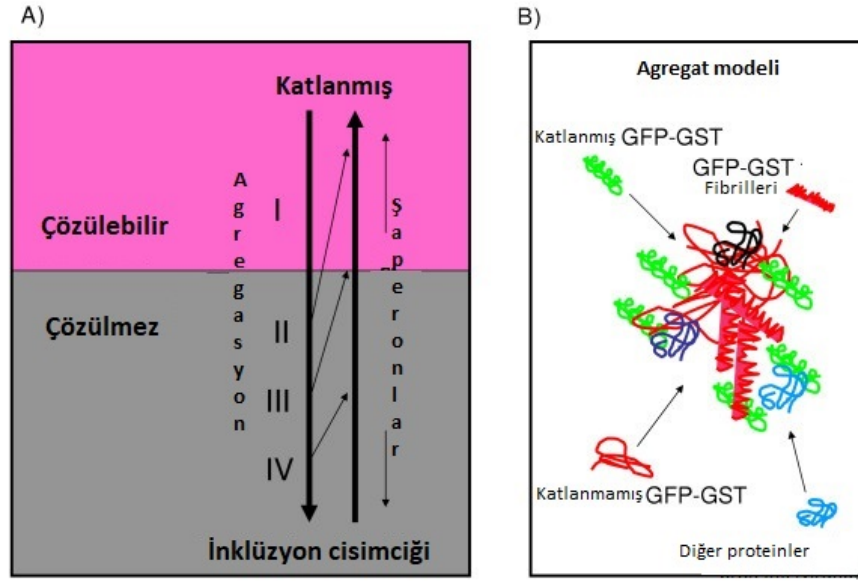
Sitokin üretimi, T hücresi polarizasyonu ve DC (Dendritik hücre) fonksiyonel profilin G-CSF ile indüklenen modülasyonu şematik olarak tasvir edilmiştir. G-CSF, proinflatuar ve antiinflatuar çözünür araçlar arasındaki dengeyi değiştirebilir, Treg hücrelerinin farklılaşmasını ve mobilizasyonunu destekleyebilir ve hem hayvanlarda hem de insanlarda tolerojenik DC'leri indükleyebilir. sTNF-R, çözünür TNFR'ler; a artmış sitokin üretimini gösterir (Rutella ve ark., 2005).

2.5. İnküzyon Cisimcikleri ve Protein Agregasyonu

Escherichia coli'de üretilen rekombinant proteinler, protein katlanmasındaki anormalliklerden dolayı doğru üçüncül yapıları oluşturamadıklarından sıklıkla hızla toplanmakta veya bozunmaktadır (Şekil 2.5.). Bazı durumlarda GroEL-GroES ve DnaK-DnaJ-GrpE gibi moleküler şaperonlar, protein katlanmasını kolaylaştırarak aktif protein üretimini arttırmaktadır. (Thomas ve ark., 1997). Önceki çalışmalarda koekspresyon sistemlerinden birini birlikte eksprese ederek *E. coli*'de aktif rekombinant proteinlerin üretimini geliştirmek için çok çaba harcanmıştır. Çoğu durumda GroE birlikte ifadesinin etkileri incelenmiş, fakat DnaK, DnaJ birlikte ifadesinin etkileri genellikle GrpE'nin eşzamanlı birlikte ifadesi olmadan test edilmiştir. Ancak, bu girişimler tam olarak başarılı olamamıştır. Çünkü protein katlanmasına ilişkin bilgilerimizin mevcut durumu, belirli bir protein için şaperonlardan hangisinin etkili ve yararlı olabileceğine ilişkin rasyonel öngörülerini engelleyebilmektedir (Wall ve Plückthun, 1995).

2.6. Şaperon Sistemler ve Koekspresyon

Rekombinant teknoloji ile üretilen proteinleri yeniden katlayabilmek çok önemlidir, çünkü tüm sürecin maliyet etkinliğinde büyük bir engel oluştururlar (Datar ve ark., 1993). Nispeten yüksek konsantrasyonlarda doğru katlanmış proteinleri geri kazanabilmek de önemlidir. Örneğin. (Wier ve ark., 1987) rekombinant interlökin-2'nin en yüksek geri kazanımının yalnızca 0.007 mg/ml'lik bir konsantrasyonda mümkün olduğunu göstermiştir. Bu yaklaşık %30'luk bir iyileşmeyi temsil eder. Proteinlerin doğru şekilde katlanmış formlarını daha yüksek konsantrasyonlarda geri kazanabilmek bu alanda çalışan bilim insanlarının ilgisini çekmektedir. (Schrödel ve de Marco, 2015) tarafından yapılan çalışmada, agregasyon mekanizmasının anlaşılabilmesi için Glutasyon-S-transferaz (GST) ve yeşil floresan protein (GFP) füzyonu, şaperonlu ve şaperonsuz ekspresyon sistemlerinde incelenmiştir (Şekil 2.5.). Çalışmada moleküler şaperonların, protein katlanmasında verimliliği artırarak protein çözünürlüğüne katkı sağlaması araştırılmıştır.



Şekil 2. 5. Agregasyonun şematik gösterimi (Schrödel, ve de Marco, 2015-modifiye edilmiştir).

Schrödel ve de Marco, (2015) tarafından oluşturulan agregasyon şemasında GFP-GST füzyonunun şaperon ve şaperonsuz nasıl katlandığı gösterilmiştir. Şemada (A) agregasyon dinamiği olmak üzere, GFP-GST (Yeşil floresan protein-Glutatyon-S-transferaz enzimi füzyonu) agregatları birikerek hem çözünür hem de çözünmez agregatlar oluşturmaktadır. Şaperon etkinliği, kümelenme sürecini, kümeler tarafından ulaşılan karmaşıklık derecesiyle zıt orantılı bir şekilde tersine çevirebilir ve ayrıca yapılandırılmış komplekslere doğru kümelenmenin artışında rol oynayabilir. (B) Agregat modeli. GFP-GST kümelenmesi, muhtemelen fibriller öncesi yapılara çöken yanlış katlanmış tekli proteinlerle başlamaktadır. Bunlar, daha büyük amiloid fibrilleri oluşturmak için yeni moleküllerin toplanmasını katalize eder. İlk aşamalarda, farklı katlanma derecelerine ve amiloidasyona sahip moleküllerin birlikte varlığı açıkça görülmektedir. Ön fibriller, kısmen yanlış katlanmış GFP-GST moleküllerinin bağlandığı topaklaşma sürecinin başlangıcını oluşturabilir. Bunlardan bazıları hala floresan işlevselliği ile uyumlu yerel benzeri bir yapıyı korur. Agregasyon kümeleri, diğer proteinleri muhtemelen spesifik olmayan bir şekilde hapsedebilir (Schrödel ve de Marco, 2015).

Koekspresyon ile Proteinlerin Geri Kazanımı

Çoğu zaman, *Escherichia Coli*'de rekombinant protein ekspresyonu, IB' ler (Inclusion Bodies) olarak bilinen çözünmez agregaların oluşumuna yol açar (Hartley ve Kane, 1988). IB agregalarından aktif proteinin geri kazanımı çoğu zaman zahmetli ve masraflı bir iş haline gelebilmektedir hatta zaman zaman çözünürlük ve yeniden katlama yöntemlerinin standardizasyonunu gerektirir (Burgess, 2009). IB'lerden proteinlerin saflaştırılmasıyla ilişkili en büyük engel, rekombinant proteinlerin doğal konformasyona sub-optimal yeniden katlanmasıdır (Rudolph ve Lilie, 1996). IB proteinlerini çözündürmek için yapılan refolding (yeniden katlama) prosesleri genellikle yüksek konsantrasyonlarda üre veya guanidin hidroklorür (GdmCl) adı verilen bir kimyasal kullanılarak gerçekleştirilir. Yüksek konsantrasyonlarda, üre ve GdmCl gibi kaotropik proteinleri tamamen denatüre eder ve yeniden katlama sırasında kümelenme eğilimini artırarak, IB'lerden biyoaktif proteinin geri kazanımı çoğu zaman çok düşük verimlilik ile sonuçlanmaktadır (Upadhyay ve ark., 2014).

Koekspresyon genellikle her biri bir alt birimin ve farklı bir seçim markerinin genini taşıyan iki veya daha fazla plazmit ile gerçekleştirilir. Plazmitler de farklı uyumlu replikonlara sahip olmalıdır, ancak aynı replikona sahip plazmitlerle birlikte ekspresyon gösterilmiş olmalıdır. Birden fazla vektör yerine, aynı vektöre birkaç gen eklenebilir. Bu, birden fazla çoklu klonlama alanına sahip bir vektör ve her klonlama adımı için farklı kısıtlama enzimleri setlerinin kullanılmasını gerektirir. Genler, tek tek farklı promotörlerden veya tek bir promotörden transkripte edilir ve bu da uzun bir polistronik mRNA'ya yol açar. Polisistronik ekspresyonun, bir protein kompleksinin stokiyometrisini etkilemek için kullanılabilecek olan daha aşağıya doğru kodlanmış proteinin daha düşük ekspresyonuna yol açtığı bildirilmiştir. Polisistronik transkripsiyona kıyasla bireysel promotörlerle birkaç kat daha yüksek ekspresyon bildirilmiştir (Scheich ve ark., 2007). Çizelge 2.1.'de bazı ticari şaperon proteinlerin ekspresyonundan sorumlu plazmitler listelenmiş ve bu tez çalışmasında bu sistemler kullanılmıştır.

Çizelge 2.1. Takara firmasına ait farklı şaperonların sentezinden sorumlu ticari plazmit vektörleri : (Anonim j, 2018)

No	Plazmit	Şaperonlar	Promotor	İndükleyici Ajan
1	pG-KJE8	dnaK (70kDa) dnaJ (40 kDa) grpE (22 kDa) groES (10 kDa) groEL (60 kDa)	araB Pzt-1	L- Arabinoz Tetrasiklin
2	pGro7	groES (10 kDa) groEL (60 kDa)	araB	L- Arabinoz
3	pKJE7	dnaK (70kDa) dnaJ (40 kDa) grpE (22 kDa)	araB	L- Arabinoz
4	pG-Tf2	groES (10 kDa) groEL (60 kDa) Tig (56 kDa)	Pzt-1	Tetrasiklin
5	pTf16	Tig (56 kDa)	araB	L- Arabinoz

Aşağıda bazı şaperon proteinler ve etki mekanizmaları sıralanmıştır:

PDI: Protein disülfür İzomeras, hem izomeras hem de bir şaperon gibi davranan bir enzimdir. Protein olgunlaşması ve disülfür bağı oluşumu sırasında polipeptit zincirinin katlanmasına ve birleştirilmesine yardımcı olur.

GroEL / GroES: GroEL ve ko-şaperonin GroES, proteinlerin uygun şekilde katlanması için birlikte çalışır. Yerli olmayan proteinler önce GroEL'in hidrofobik amino asitlerine bağlanır ve daha sonra ATP ve GroES'den tetikleme yardımıyla boşluğa geçirilir ve GroEL boşluğu ile ATP hidrolize edilir ve uygun şekilde katlanmış protein dışarıya salınır.

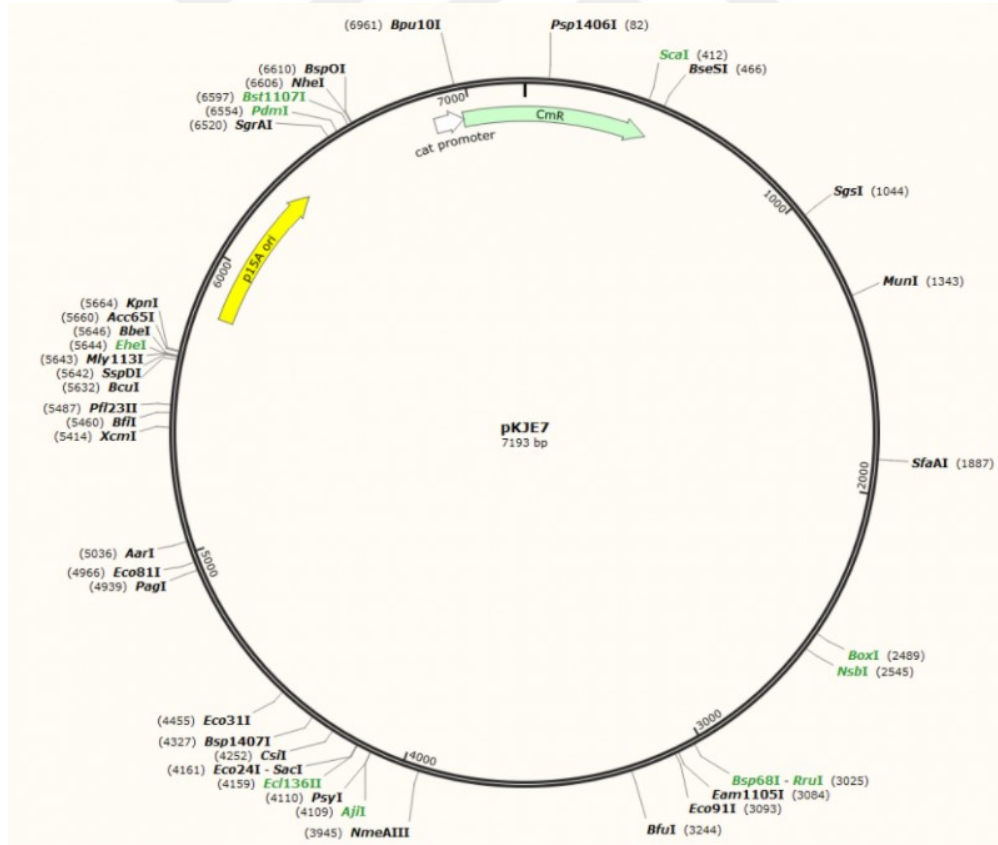
TF: Tetikleyici faktör, yeni doğan polipeptid zincirine bağlanan ilk şaperondur. TF, yeni sentezlenen proteini açık konformasyonda tutar ve birikmesini önler. Tetikleyici faktör ayrıca Peptidil-Prolil cis / trans izomeras (PPlaz) aktivitesine sahiptir.

Skp: *E. coli*'de periplazmik on yedi kilodalton proteini (Skp) şaperon görevi görür ve bakteriyel periplazmada uygun protein katlanmasına yardımcı olur. Proteinlerin skp ile birlikte ekspresyonu, rekombinant proteinlerin düzgün katlanmasına yardımcı olur. Skp ayrıca virülans faktörlerinin birlikte ifadesinde de kullanılır.

FkpA: Koekspresyonu, FkpA ile scFv fragmanının üretkenliğinin on katını arttırdı. Bakteriyel zarf proteinlerinin agregat oluşumunu önleyen periplazmik bir proteindir. Şaperon aktivitesinin yanı sıra PPlase aktivitesine de sahiptir.

VanX: Bu, hücre içi agrega oluşumundan kaçınarak istenen proteini ortam içine serbest bırakmak için kullanılan bir liziz ortağıdır (Anonim d, 2019).

PKJE7 Plazmit Vektöre Ait Gen Haritası



DnaK: HSP 70 olarak bilinen DnaK, preprimozomal kompleksten lambda O ve P proteinlerini serbest bırakmak için DnaJ proteini ile ATP'ye bağımlı bir şekilde hareket ettiği faj lambda DNA replikasyonunun başlatılmasında önemli bir rol oynar. DnaK ayrıca bazı durumlarda DnaA proteini ile benzer bir etkileşim yoluyla kromozomal DNA replikasyonunda rol oynayarak hiperozmotik şoka verilen yanıtta aktif olarak katılır (Anonim f, 2020).

DnaJ: Faj lambda ve birkaç plazmidin replikasyonunun kökeninde bir protein kompleksini parçalamak için DnaK ve GrpE ile etkileşime girer. Stres kaynaklı denatüre proteinlerin kümeleşmesini önleyerek ve yine otonom, DnaK'dan bağımsız bir şekilde proteinleri ayırarak hiperozmotik ve ısı şokuna tepkiye aktif olarak katılır. Katlanmamış proteinler başlangıçta DnaJ'ye bağlanır; DnaJ'ye bağlı protein ile etkileşim üzerine, DnaK, bağlı ATP'yi hidrolize ederek kararlı bir kompleks oluşumuna yol açar. GrpE, DnaK'dan ADP'yi çıkarır; DnaK'ya ATP bağlanması, substrat proteininin salınmasını tetikler, böylece reaksiyon döngüsünü tamamlar. Tam verimli katlama için DnaJ, DnaK ve GrpE arasında birkaç tur ATP'ye bağlı etkileşim gereklidir (Anonim g, 2020).

grpE: DnaK ve GrpE ile birlikte stres kaynaklı denatüre proteinlerin toplanmasını önleyerek hiperozmotik ve ısı şokuna tepkiye aktif olarak katılır. DnaK için nükleotid değişim faktörüdür ve bir termosensör olarak işlev görebilir. Katlanmamış proteinler başlangıçta DnaJ'ye bağlanır; DnaJ'ye bağlı protein ile etkileşim üzerine, DnaK, bağlı ATP'yi hidrolize ederek kararlı bir kompleks oluşumuna yol açar. GrpE, DnaK'dan ADP'yi çıkarır; DnaK'ya ATP bağlanması, substrat proteininin salınmasını tetikler, böylece reaksiyon döngüsünü tamamlar. Tam verimli katlama için DnaJ, DnaK ve GrpE arasında birkaç tur ATP'ye bağlı etkileşim gereklidir (Anonim h, 2020).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Çizelge 3.1. Tez çalışmalarında kullanılan cihazlar

Cihaz	Marka ve Modeli
Agaroz jel elektroforez seti	BIORAD
Buz makinası	VISION
Buzdolabı	VESTEL GTP 455A
Çalkalayıcı İnkübatör	BIOSAN ES 20
Çalkalayıcı İnkübatör	ZHICHENG- ZHWY111C
Dikey Soğutucu +4 °C	Dikey Soğutucu +4 °C
DNA Engine, PCR makinesi	BIORAD
Dondurucu (-80)	HETTICH
Etüv	MEMMERT
Güç kaynağı (SDS ve agaroz jel elektroforezi için)	BIORAD
Isıtıcı Magnetik Karıştırıcı	VELP SCIENTIFICA ARE
MD500 mikrodalga fırın	ARÇELİK
Mikro 22R santrifüj	HETTICH
Otoklav (50L)	HMC HIRAYAMA
SDS jel elektroforez seti	BIORAD
Spin cihazı	BIOSAN, Combi Spin FVL 2400N
Termostatlı Blok Isıtıcı	BIOSAN
Ultrasantrifüj	VISION VS 30000i

Çizelge 3.1. (Devam) Tez çalışmasında kullanılan cihazlar

UV Göstergesi	SYNGENE SYTC/1422
UV/VIS Spektrofotometresi	VARIAN CARRY 50

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar

Bu tez çalışmasında kullanılan bazı kimyasal ve gereçler çizelge 3.2.'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Tez çalışmalarında kullanılan kimyasal ve gereçler.

Akrilamid	Amresco
Ampisilin	Biobasic
Bezamidin	Merck
CaCl ₂ .2H ₂ O	Carlo Erba
Diyaliz membranı	Spectro
DMSO (hücre kültürü için)	PanReac AppliChem
Etanol	Merck
Gliserol	Euromedex
Kloramfenikol	Biobasic
LB Besiyeri	Bio Life
Maya ekstraktı	Bio Life
NaH ₂ PO ₄	Carlo Erba
DMEM besi ortamı (Hücre kültürü için)	Florabio
Plazmit DNA saflaştırma kiti	Biobasic
PMSF	Sigma Aldrich
Protein konsantratörü	Ge Healthchare
Protein ladder	Goldbio
SDS	Serva
Şaperon plazmit set	TaKaRa
TEMED	Biorad
Trypsin-EDTA	Biological Industries

3.1.3. Kullanılan Çözeltiler

Ampisilin Çözeltisi: 1.5 g ampisilin tartılarak 15 mL saf suda çözölmüş, steril 0.2 µm'lik filtreden geçirilerek mikrotüplere tüplere bölünerek (-20°C) derin dondurucuda stoklanmıştır.

Kloramfenikol Çözeltisi: Kloramfenikol 20 mg/mL olacak şekilde hesaplanmış, mutlak etanolde çözölüp 0.2 µm'lik filtreden geçirilerek steril edilmiştir.

PMSF çözeltisi: 150 µg tartılan PMSF 1 mL mutlak etanol ile çözölerek hazırlanmıştır.

IPTG: 1.5 g IPTG, 15 mL steril distile suda çözölmüş ve steril 0.2 µm'lik filtreden geçirilerek mikrotüplere bölünerek ve -20°C soğutucuda stoklanmıştır.

LB çözeltisi: 20 g LB (Luria-Bertani) Broth Base 1 000 mL suda çözölmüştür. Hazırlanan 1000 mL'lik çözelti 250'ser mL olacak şekilde iki tane stok şişesine alınmış ve üzerine 3.75 g agar ilave edilip karıştırılmış ve otoklavlanmıştır. Artan LB çözeltisi 50 mL olacak şekilde erlenlere ve 4 mL olacak şekilde deney tüplerine konulup ağız kısımları alüminyum folyo ile kapatılarak otoklavlanmıştır.

SDS PAGE Jel Bileşenleri:

Alt Tampon: 182 g Tris (1.5 M), 4 g SDS (%0.4) 1000 mL saf suda çözölerek pH:8.8 olarak ayarlanmıştır.

Üst Tampon: 60.5 g Tris (1.5 M), 4 g SDS (%0.4) 1000 mL saf suda çözölerek pH:6.6 olarak ayarlanmıştır.

Yürütme jeli: 2.7 mL %40 akrilamid, 2.25 mL alt tampon, 4 mL su, 50 µl %10 APS ve 20 µl TEMED hızlıca karıştırılarak hazırlanmıştır.

Yükleme jeli: 0.35 mL %40 akrilamid, 1 mL üst tampon, 2.55 mL su, 50 µl %10 APS ve 10 µl TEMED. Tüm maddeler katılmıştır ve en son TEMED eklenip kasete dökülmüştür. Yürütme jeli polimerleştikten sonra üzerine yükleme jeli dökülerek polimerleşmesi beklenmiştir.

SDS Jel boyama (Staining) Çözeltisi: 0.5 g Coomassie Brilliant Blue R-250, 450 mL metanol içerisinde çözülüp filtre kâğıdından süzöldükten sonra, karışımın üzerine 100 mL asetik asit ve 450 mL saf su eklenerek hazırlanmıştır.

Destaining Çözeltisi: 100 mL metanol, 100 mL asetik asit ve 800 mL saf su karışımından hazırlanmıştır.

Amonyum Persölfat (APS-%10): 0.5 g APS 5mL saf su içerisinde çözölkerek hazırlanmıştır.

Afinite Kromatografisiyle Saflaştırmada Kullanılan Çözeltiler:

NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ tamponu: 6 mL 0.2 M NaH₂PO₄ ve 0.2 M 435 mL Na₂HPO₄ karıştırıldıktan sonra pH:8.0'a ayarlanarak toplam hacim saf su ile 1000 mL'ye tamamlanmıştır.

Yükleme tamponu (Loading Buffer) 2.92g NaCl 500 mL NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ tamponunda (pH:8.0) çözölkerek hazırlanmıştır.

Yıkama tamponu (Wash Buffer): (25 mM imidazol 100 mM NaCl-100 mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ pH: 8): 0.85g imidazol, 2.92 g NaCl 500 mL NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ tamponunda (pH:8.0) çözölkerek hazırlanmıştır.

Elüsyon tamponu (Elution Buffer): (300 mM imidazol 100 mM NaCl-100 mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ pH: 8.0): 10.2 g imidazol, 2.92 g NaCl 500 mL NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ tamponunda (pH: 8.0) çözölmüştür.

Tris Tamponu: 12.12 g tris alınarak bir miktar suda çözülmüştür. pH derişik HCl ile 7.5'e getirilmiş ve 2.92 g NaCl eklenmiştir. Toplam hacim su ile 1 000 mL'ye tamamlanmıştır.

300mM imidazol Tris/HCl Tamponu: 2.04 g imidazol 100 mL Tris/HCl tamponu içinde çözülmüştür. pH derişik HCl ile 7.5'e getirilerek hazırlanmıştır.

Diyaliz İçin Kullanılan Çözeltiler:

Diyaliz tamponu: 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.78 g Na₂HPO₄, 0.24 g KH₂PO₄ tartılarak 800 mL suda çözülmüştür. pH HCl ile 7.4' e ayarlanıp, toplam hacim 1 000 mL olarak tamamlanmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1 Rekombinant GCSF'nin Üretilmesi ve Saflaştırılması

Rekombinant Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör (GCSF) Geninin Nükleotid Dizisinin Tasarımı

Granülosit koloni uyarıcı faktör (GCSF) 'e ait aminoasit dizisi alınmıştır (GCSF Erişim numarası: NP_000750).

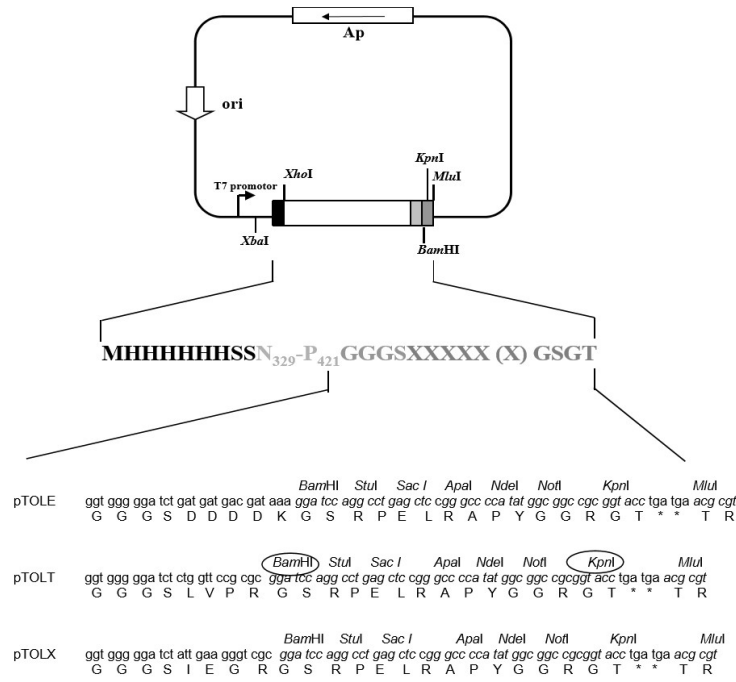
"MAGPATQSPMKLMALQLLLWHSALWTVQEATPLGPASSLPQSFLKCLEQVR
KIQGDGAALQEKLVSCEATYKLCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAG
CLSQLHSGLFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQQMEELGMA
PALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEVSYRVLRHLAQP"

NCBI üzerinden elde edilen GCSF proteinine ait DNA dizisi, ekspresyon için optimize edilmiştir. Bu aşamada ilgili genin *E. coli*'de istenilen miktarda ifade edilebilmesi için kodon optimizasyonu yapılmıştır (Karimi ve ark., 2015). Kodon optimizasyonu ilgilenilen gen dizisinde bulunan ve *E. coli* K12 mikroorganizmasında düşük ifade

edilen kodonlar daha yüksek sıklıkla ifade edilen kodonlar ile değiştirilmiştir. İnsan GCSF proteinine ait, *E. coli* bakterisi için optimize edilmiş nükleotit dizisi aşağıda verilmiştir (Bozkurt, 2018).

“ATGGCCGGCCCCGCCACCCAGAGCCCCATGAAGCTGATGGCCCTGCAGCT
GCTGCTGTGGCACAGCGCCCTGTGGACCGTGCAGGAGGCCACCCCCCTGGG
CCCCGCCAGCAGCCTGCCCCAGAGCTTCCTGCTGAAGTGCCTGGAGCAGGT
GCGCAAGATCCAGGGCGACGGCGCCGCCCTGCAGGAGAAGCTGGTGAGCG
AGTGCGCCACCTACAAGCTGTGCCACCCCGAGGAGCTGGTGCTGCTGGGCC
ACAGCCTGGGCATCCCCTGGGCCCCCCTGAGCAGCTGCCCCAGCCAGGCCC
TGCAGCTGGCCGGCTGCCTGAGCCAGCTGCACAGCGGCCTGTTCCTGTACCA
GGGCCTGCTGCAGGCCCTGGAGGGCATCAGCCCCGAGCTGGGCCCCACCCT
GGACACCCTGCAGCTGGACGTGGCCGACTTCGCCACCACCATCTGGCAGCA
GATGGAGGAGCTGGGCATGGCCCCCGCCCTGCAGCCCACCCAGGGCGCCAT
GCCCCCCTTCGCCAGCGCCTTCCAGCGCCGCGCCGGCGGCGTGTGGTGGC
CAGCCACCTGCAGAGCTTCCTGGAGGTGAGCTACCGCGTGTGCGCCACCT
GGCCCAGCCC”

Çalışmada daha önce (Bozkurt ve ark., 2018) tarafından belirlenen gen dizisi pTolT vektörüyle (Şekil 3.1.) füzyon haline getirilerek bir ekspresyon vektörü tasarlanmıştır.



Şekil 3.1. pTOL plazmit vektör sisteminin poli-linker bölgesinin detaylı restriksiyon enzimleri ile birlikte verilen DNA dizisi (Anderluh ve ark., 2003).

Plazmit DNA Saflaştırma:

Stoklarda hazır bulunan GCSF proteinini ifade eden gen dizisi ile füzyon hale getirilmiş pTolT vektörünü barındıran host olan *E. coli* B121 plysE hücreleri -80 °C soğutucudan dış ortamdaki termal dengeyi korumak adına buz içerisinde laboratuvara getirilmiştir. Ardından sıvı çözelti olarak hazırlanan kloramfenikol ve ampisilin antibiyotikleri eklenerek eden 4 mL’lik LB besiyeri ihtiva eden tüplere 4 µl olacak şekilde ekim yapılmıştır. 16 saat 37 °C 240 rpm kültürasyon işleminden sonra plazmit DNA saflaştırılma aşamasına geçilmiştir. Plazmit DNA saflaştırma işlemi için renk indikatörü olmayan “Geneaid ® Presto™ Mini Plasmid Kit” kullanılmıştır. İşlem süresince protokol titizlikle uygulanmıştır. Çalışmada uygulanan protokol Çizelge 3.3.’te belirtilmektedir.

Çizelge 3.3. Plazmit DNA saflaştırma prosedürü

ADIM	İŞLEMLER
1	(HASAT) 1.5 mL kültürlenmiş bakteri hücreleri (LB ortamında büyütülen $1-2 \times 10^9$ <i>E. coli</i>) 1.5 mL mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Hücre peleti oluşturmak için oda sıcaklığında 60sn 14-16.000 rpm'de santrifüjlenmiştir ve sonra süpernatant tamamen atılmıştır. Süpernatantın tamamen atıldığından emin olmak için dar bir pipet ucu kullanılmıştır. Aynı 1.5 mL mikrosantrifüj tüpünü kullanarak 4.00 mL arasındaki sıvı kültürden <i>E. coli</i> bakterileri toplanmıştır.
2	(RESÜSPANSİYON) Hücre peletini içeren 1,5 mL mikrosantrifüj tüpüne 200 µl PD1 tamponu eklenmiştir (RNase A daha önce eklendi). Hücre pelleti vortex cihazı ile yeniden tamamen süspanse edilmiştir.
3	(HÜCRE LİZİSİ) Yeniden süspanse edilen örneğe 200 µl PD2 Tampon eklendi, ardından tüp 10 kez ters çevirerek yavaşça karıştırılmıştır. CO ₂ 'in asidifikasyonunu önlemek için kullanımdan hemen sonra PD2 Tampon şişesinin kapatılmasına dikkat edilmiştir. Genomik DNA'yı parçalayarak kontaminasyondan kaçınmak için vortexlenmemiştir. Lizatın homojen olmasını sağlamak için oda sıcaklığında en az 2 dakika bekletilmiştir. 5 dakikayı geçmemeye özen gösterilmiştir.
4	(NÖTRALİZASYON) 300 µl PD3 tampon eklenerek, ardından tüp 10 kez ters çevirmek suretiyle hızlıca karıştırılmıştır. Genomik DNA'yı parçalamaktan kaçınmak için vortexlenmemiştir. Oda sıcaklığında 3 dakika 14-16.000 rpm' de santrifüjlenmiştir.
5	(DNA Bağlanması) Tüm süpernatat PDH Sütununa aktarılmıştır. Beyaz çökeltiyi bozmadan süpernatanın tamamen aktarılmasını sağlamak için dar bir pipet ucu kullanılmıştır. Oda sıcaklığında 30 saniye boyunca 14-16.000 rpm'de santrifüjlenmiştir, ardından toplama tüpü atılmıştır. PDH Kolonu 2 mL toplama tüpüne geri yerleştirilmiştir.

Çizelge 3. 4. (Devam) Plazmit DNA saflaştırma prosedürü

6	(YIKAMA) PDH Kolonuna 400 µl W1 tamponu eklenmiştir. 30 saniye boyunca 14-16.000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Toplama tüpü atılarak PDH kolonu 2 mL yeni toplama tüpüne yerleştirilmiştir. PDH Kolonuna 600 µl Wash buffer eklenmiştir (mutlak etanol ihtiva eden). Oda sıcaklığında 30 saniye boyunca 14-16.000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Toplama tüpü atılmıştır ve ardından PDH Kolonu yeni 2 mL toplama tüpüne geri yerleştirilmiştir. Sütun matrisini kurutmak adına oda sıcaklığında 3 dakika 14-16,000 rpm' de boş santrifüjlenmiştir. Kurutulmuş PDH kolonu yeni bir 1,5 mL mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiştir.
7	(ELÜSYON) Kolon matrisinin ortasına zarar vermeden 50 µl ultra saf su mikropipet yardımı ile aktarılmıştır. 14-16.000 rpm'de oda sıcaklığında 2 dakika santrifüjlenerek saf plazmit DNA elüe edilmiştir. Kolon matrisi atılmıştır, DNA içeren tüp alınarak transformasyon işlemine geçilmiştir.

Transformasyon

Bu aşamada GCSF proteinini eksprese etmeye programlanmış pTolT vektörünü barındıran *E. coli* hücreleri ile Çizelge 2.1'deki 5 farklı şaperon sistemin ayrı mikrotüplerde transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Böylece Çizelge 2.1.'de belirtilen 1, 2, 3, 4 ve 5 no'lu şaperon plazmitleri ve GCSF proteinini eksprese etmeye programlanmış pTolT vektörünü barındıran *E. coli* hücrelerinin elde edilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada ısı şoku ile transformasyon yapılarak, saflaştırılan plazmit DNA'nın hücre içerisine alınması işlemi gerçekleştirilmiştir. Uygulanan prosedür aşağıda belirtilmektedir.

- -80°C’soğutucudan termal stabiliteyi korumak adına buz içerisinde alınan GCSF proteinini eksprese etmeye programlanmış kompetent hücrelerden 200 µl alınarak üzerine 5 µl şaperon plazmit eklenmiş ardından yavaşça hassas hücelere zarar vermeden karıştırılarak 1 saat buz banyosunda bekletilmiştir.
- Hücrelerin 1 saat buzda beklemesinin ardından 2 dakika süreyle 42°C sıcaklıkta 2 dakika ısı şokuna maruz bırakılmıştır.
- Sonrasında karışım çıkarılarak 5 dakika süresince buz içerisinde bekletilmiştir.
- Son olarak karışıma 250 µl LB Besiyeri eklenerek hücreler 30 dakika süresince 37 °C ve 240 rpm’de ortama alışmaları açısından ön inkübasyona tabii tutulmuştur. Sonrasında petri kabı içerisindeki antibiyotikli LB-Agar besiyerine drigalski spatülü ile steril bir şekilde yayma ekim yapılarak yine 37°C sıcaklıkta bir gece inkübasyona bırakılmıştır (Hanahan, 1983).

Tek Koloni Hücre Ekimi

Çizelge 2.1.’deki 5 farklı şaperon plazmidi ve GCSF proteinini eksprese etmeye programlanmış pTolT vektörünü barındıran *E. coli* hücreleri için 5 ve kontrol amaçlı olarak sadece GCSF proteinini eksprese etmeye programlanmış pTolT vektörünü barındıran *E. coli* hücrelerinin ekimi için 50 mL’lik LB antibiyotikli sıvı besiyeri etiketlenerek hazırlanmıştır. Ardından her bir sistemden optimum hücre yoğunluğuna ve büyüklüğüne ulaşmış hücre kolonileri alınarak steril pipet ucu ile etiketlenmiş antibiyotikli sıvı LB besiyerlerine inokülasyonu sağlanmıştır.

Şaperon Sistemler ile Koekspresyon Sonucu GCSF'nin Doğru şekilde Katlayan Sistemin Belirlenmesi

Farklı şaperon plazmitler için 5 farklı 50 mL'lik LB antibiyotikli sıvı besiyerinde büyütülen hücreler santrifüj yardımı ile toplanarak parçalanmış, SDS PAGE yöntemi ile yapılan çalışmalar sonrası GCSF proteininin hangi şaperon sistemde inklüzyon cisimciği olarak çökmeden çözülebilir formda ekspresyonunun gerçekleştiği belirlenmiştir.

E. coli Hücreleri ile Büyük Ölçekte Ekspresyon

Yapılan çalışma sonrası etkili görülen PKJE7 şaperon sistemi kullanılarak hücre kültür çalışmaları için büyük ölçekte üretim sağlanmıştır. Bunun için gerekli prosedür oluşturularak çalışmanın yapılacağı günün öncesinde akşamdan 4 mL'lik antibiyotikli LB besiyerine tek koloni hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. İnokülasyonun gerçekleştiği ve hücrelerin büyüdüğü gözlenen kültürden alınan hücreler 600 mL Amp+Chl antibiyotikleri bulunan LB besiyerine inoküle edilmiştir. 240 rpm ve 37 °C sıcaklıkta hücrelerin belirli bir yoğunluğa ulaşması sağlanmıştır. O.D = 400 olduğunda şaperon proteinlerin ekspresyonunu arttırmak için ortama sıvı L-Arabinoz eklenmiştir ve SDS PAGE için örnek alınmıştır. O.D = 600 olduğunda ise GCSF'nin ekspresyonunu hızlandırmak için ortama indükleyici ajan IPTG eklenmiştir. Gün boyu kültürün büyümesi için ortam şartları sağlanmış, gün sonunda hücreler SDS-PAGE için örnek alındıktan sonra 8000 rpm'de 6 dakika santrifüjlenerek -20 °C soğutucuya kaldırılmıştır.

E. coli Hücrelerinin Parçalanması ve Proteinlerin Açığa Çıkarılması

Hedef protein endojen olduğu için, saflaştırmak için hücreyi parçalayarak biyomoleküllerin açığa çıkarılması gerekmektedir. Büyük ölçekte gerçekleştirilen üretim sonrası elde edilen hücreler termal stabiliteye dikkat edilerek yeter miktarda parçalama tamponu ile homojen hale getirilmiştir. Oluşturulan süspansiyona eser miktarda enzimatik parçalama sağlayarak hücrelerin yeterli oranda lizise uğraması için

ticari lizozim enzimi eklenmiştir. Proteazların hedef proteini parçalamaması için yine ortama proteaz inhibitörü olarak 100 mM bezamidin ve 100 mM PMSF eklenmiştir. Oluşan süspansiyon, gerekli termal stabilite sağlanarak mekanik parçalama için ultrasonikatör ünitesine alınmıştır. Yaklaşık 1 saat süren sonikasyon işlemi sonrası zaman kaybetmeden ultra santrifüj işlemine geçilmiştir. Bu işlem 1 saat süre, +4°C, 30.000 rpm koşullarında gerçekleştirilmiştir. İşlem sonrası elde edilen süpernatant ve pellet örnekleri alınmıştır.

Afinite Kromatografisi ile GCSF Proteininin Saflaştırılması

Afinite kromatografisi işleminde kolon dolgu maddesi (rezin) olarak Ni-NTA agaroz resin kullanılmıştır. Bu yöntemde GCSF proteininin gen dizisi tanımlanırken eklenen 6 adet histidin aminoasit kuyruğunun (His-Tag) kolon dolgu maddesi olan nikel' e karşı ilgisinden dolayı kolona tutunması sağlanmaktadır. Kolondan geçirilen süpernatant içerisinde bulunan GCSF, yıkama tamponu ile yıkanarak kolondaki istenmeyen proteinler ve diğer hücre metabolitleri uzaklaştırılmıştır. Sonrasında elüsyon işleminde imidazol içeren elüsyon tamponu ile kolona tutunan protein ayrılarak elde edilmiştir.

Diyaliz ile Saf GCSF' nin Elde Edilmesi

Diyaliz membranına aktararak sızması önlenen elüsyon, imidazolün seyreltilmesi ve ortamdan uzaklaştırılması amacıyla diyaliz çözeltisi içerisine konulmuştur. 1L diyaliz tamponu içerisinde gece boyu +4 °C'de manyetik karıştırıcı yardımıyla yavaşça karıştırılmak suretiyle istenmeyen küçük boyutlu kimyasal ve metabolitlerden uzaklaştırılarak hücre kültür çalışmaları için alınmıştır.

3.2.2. Rekombinant GCSF' nin Aktivite Tayini

pTolT-GCSF füzyon sisteminin PKJE7 şaperon plazmit ile koekspresyon olarak gerçekleştirilmiş olduğu üretim ve saflaştırma sonrasında GCSF'nin aktivitesi HUVEC (Human umbilical vein endothelial cell) hücre hattı ile proliferasyon ve MTT analizleri yapılmıştır.

HUVEC Hücre Hattı İçin DMEM Besi Ortamı Hazırlanması

İnsan göbek bağı endotel hücreleri (HUVEC -Human Umbilical Vein Endothelial Cells) rekombinant GCSF'nin aktivite testi kapsamında proliferasyon ve MTT analizleri yapmak için DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) besi ortamında %5 CO₂ nem ve 37 °C sıcaklık olarak belirlenen ortam koşullarına sahip inkübatörde ileri derece steril koşullar altında büyütülmüşlerdir.

DMEM Besi Ortamı Bileşenleri:

DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium)

%1 L-glutamin

%15 FBS (Fetal Bovine Serum)

%0.1 gentamisin

Endotel Hücrelerinin Çözülmesi ve Kültivasyonu

-80°C'de saklanan cryo-tüp içinde bulunan hücre hattının 3/4'ü çözününceye kadar 37°C sıcak su banyosunda bekletilmiştir. Cryo-tüp' ün dışı etil alkol ile temizlenerek içine steril kabin içerisinde toplam hacim 10 mL olacak şekilde DMEM besi ortamı ilave edilmiştir. Santrifüj yuvasına tam oturması için gerekli aparata geçirilerek kryoprotektan ajanı DMSO tarafından toksik etkiye uğramaması için hızlıca santrifügasyon işlemine geçilmiştir. 800 rpm'de 5 dakika +4°C sıcaklıkta santrifüjlenen

hücreler besi ortamı uzaklaştırılarak alınmıştır. Hücrelerin termal şoka girmesini önlemek amacıyla daha önceden 37°C sıcaklığına ulaşmış 12 mL antibiyotikli DMEM besi ortamı ile süspanse hale getirilerek nemli %5 CO₂ oranı ve 37°C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. Ortalama 2 saat inkübasyon sonrası hücrelerin “mono layer” tabaka oluşturarak tutunup tutunmadıkları mikroskop altında incelenmiştir. HUVEC hücre hattına farklı konsantrasyonlarda GCSF eklenerek 24 ve 48 saat sonra büyüme mikroskop ile incelenmiştir.

Endotel Hücrelerinin Pasajlama ve Dondurulma İşlemleri

Hücreler belirli bir yoğunluğa geldiğinde ve besi ortamı fakirleştiğinde ölmeye başlar. Bu nedenle hücreler %70-80 doygunluğa ulaştığında pasajlanarak dondurulup saklanması ve besi ortamının yenilenmesi gerekebilmektedir. İşlem laminar akışlı steril kabin içerisinde gerçekleştirilmiş ve tüm malzemeler kabin içine alınmadan önce %70 etanol ile temizlenmiştir.

- Pasajlama işlemi için kullanılacak olan DMEM besi ortamı, PBS (Ca⁺² ve Mg⁺² içermeyen) ve Tripsin-EDTA işlem öncesinde sıcak su banyosunda hücreleri ısı şoku ile strese sokmamak için 37 °C olacak şekilde ısıtılmıştır.
- Flask içerisindeki eski besi ortamı yavaşça dökülmek suretiyle (yüzeye tutunmuş hücrelerin akmasına dikkat edilerek) dökülmüştür.
- Flask içerisindeki hücrelerin bulunmadığı yüzey bir kez 5 mL PBS ile yıkanmıştır.
- Hücrelerin flask yüzeyinden kalkmasını kolaylaştırmak amacı ile 1 mL Tripsin-EDTA çözeltisi hücrelerin yüzeyine dökülmüş ve yavaşça eğim verilerek her yere ulaşması sağlandıktan sonra inkübatörde 2-3 dakika boyunca enzimatik kazımanın gerçekleşmesi beklenmiştir. Kazımanın gerçekleşip gerçekleşmediğini gözlemlemek için mikroskop altında incelenmiştir.

- Hücrelerle uzun süreli temasında sitotoksik etkiye sebep olan Tripsin-EDTA çözeltisi 8-10 mL serumlu besi ortamı ile inaktif hale getirilmiştir.
- Santrifügasyon işlemi öncesinde hücre sayımı için 100 µl hücre ve 100 µl tripan mavisi homojen hale getirilmiştir.

Rekombinant GCSF' nin Endotel Hücre Büyümesine Olan Etkisi (MTT Testi):

Rekombinant GCSF'nin, HUVEC hücre hattı üzerindeki hücre canlılık etkisi MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) testi ile analiz edilmiştir. Bu çalışmada 1000 ile 15 ng/mL konsantrasyon aralığında rekombinant GCSF'nin etkinliği farklı dilüsyonlarda araştırılmıştır. Negatif kontrol olarak rekombinant GCSF içermeyen DMEM besi ortamı içerisinde HUVEC hücre hattı inkübe edilmiştir. MTT testi şu şekilde gerçekleştirilmiştir;

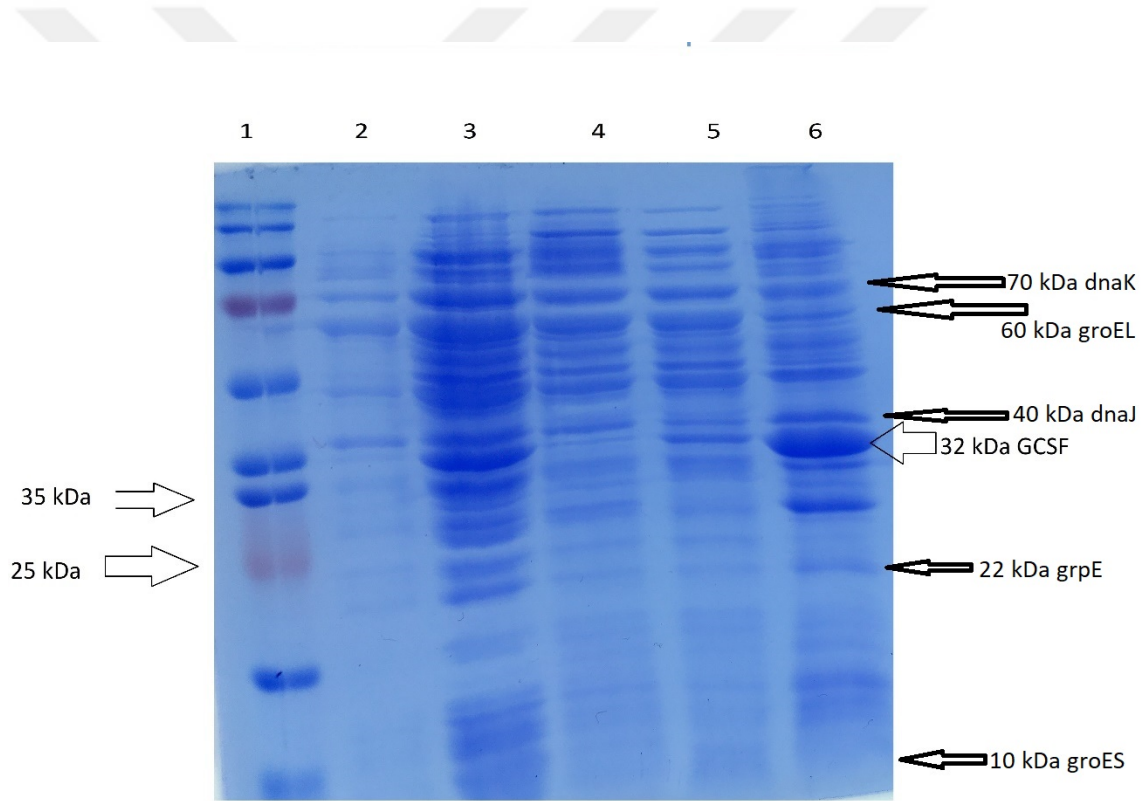
- 100 µl hücre süspansiyonu, 5×10^4 h/mL başlangıç konsantrasyonunda 96 gözlü pleytin kuyucuklarına pipet yardımıyla eşit olarak dağıtılmıştır.
- 96 gözlü pleytin kuyucuklarına ekilen hücreler %5 CO₂ ve 37°C sıcaklık koşullarında 24 saat inkübe edilmiştir.
- 24 saat inkübasyonun ardından besi ortamı 96 gözlü pleytten uzaklaştırılmıştır.
- Kültüre edilmiş ve yaklaşık %80 konfluensiye ulaşmış hücrelerin üzerine 100 ng/mL, 500ng/mL, 250 ng/mL, 125 ng/mL, 62.5 ng/mL, 31.25 ng/mL ve 15.622 ng/mL konsantrasyonlarında rekombinant GCSF eklenmiştir.
- Inkübasyon sonrasında besi ortamı 96 gözlü pleytten uzaklaştırılarak hücrelerin üzerine 0.5 mg/mL konsantrasyonda MTT içeren besi ortamı ilave edilmiştir.

- Hücreler ışıksız ortamda 37  C sıcaklık ve %5 CO₂ ortam şartları altında 3 saat süresince inkübe edilmiştir. Ardından her bir kuyucuğa 100  l DMSO eklenerek hücreler 5 dakika ışıksız ortamda bekletilmiştir. ışıksız ortamın etkisi için yine de 96 gözlü pleyt steril alimünyum folyo ile kaplanmıştır. Bu işlemde DMSO eklendikten sonra formazan kristallerinin     nmesi gerçekleşmiştir. Bu işlemde canlı hücreler tetrazolium tuzlarını hücre içine alarak mitokondriyal dehidrojenaz enzimi sayesinde mor formazan kristalleri oluşturmaktadır.
- 96 gözlü pleytin kuyucukları içerisindeki hücrelerin mikroparka okuyucu altında 570 nm dalga boyunda absorbens değerleri okunmuştur.
- Okunan absorbens değerlerine göre etken maddenin aktivite tayini yapılarak, sütun grafikte negatif kontrol (NK) ‘e göre karşılaştırılmıştır.

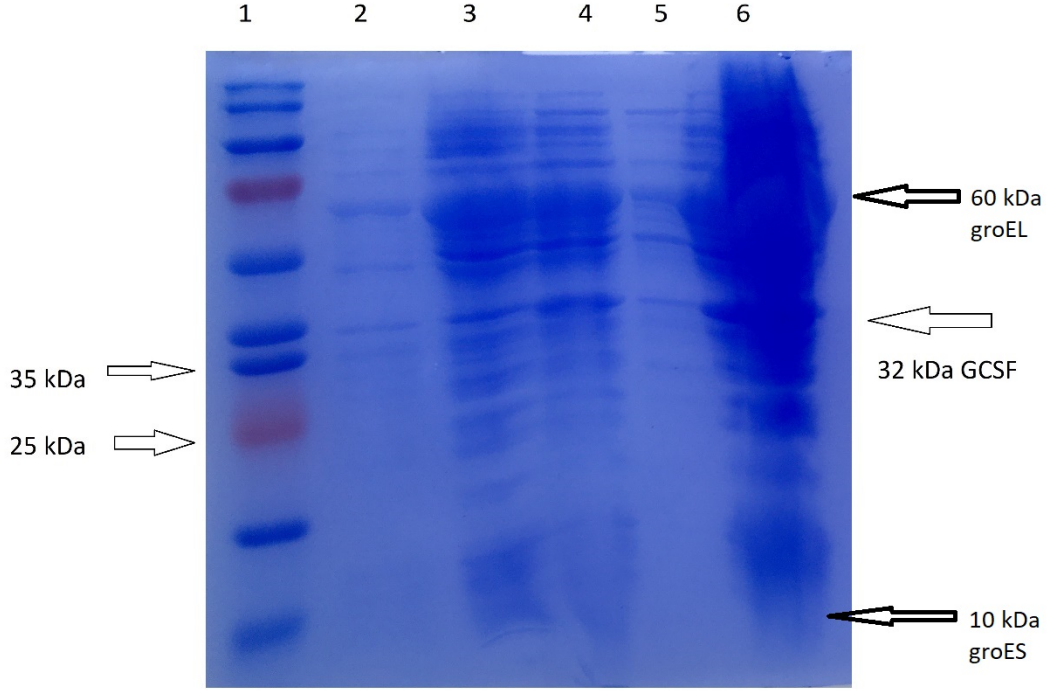
4. BULGULAR

4.1. Rekombinant Protein Üretimine Ait Bulgular

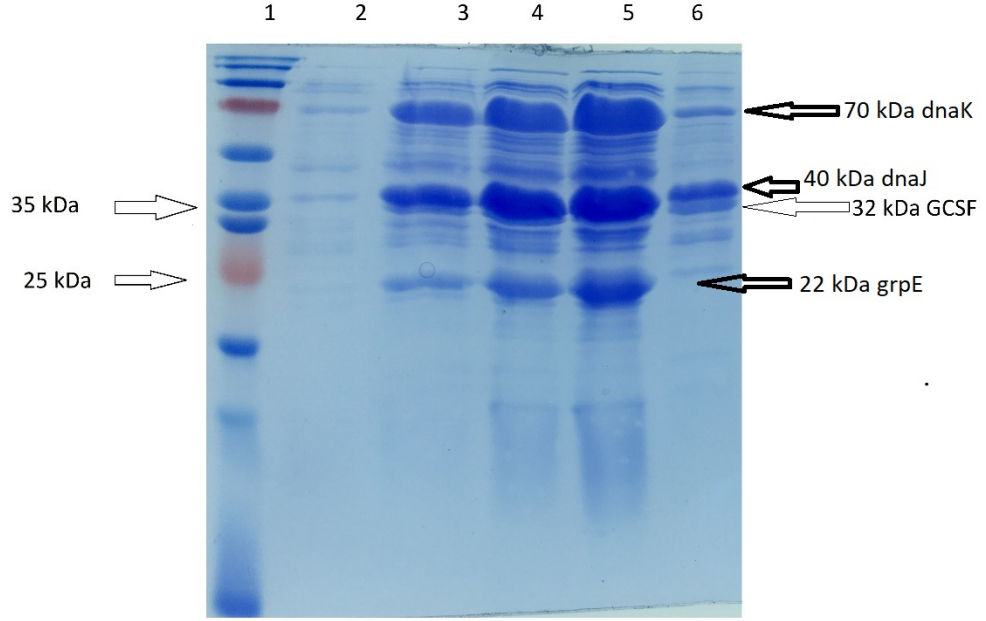
GCSF proteininin doğru katlanarak inklüzyon cisimciği şeklinde agregasyona uğramasını engellemek adına 5 farklı şaperon plazmit vektörü ile koekspresyon çalışması yapılmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen veriler aşağıda verilmiştir.



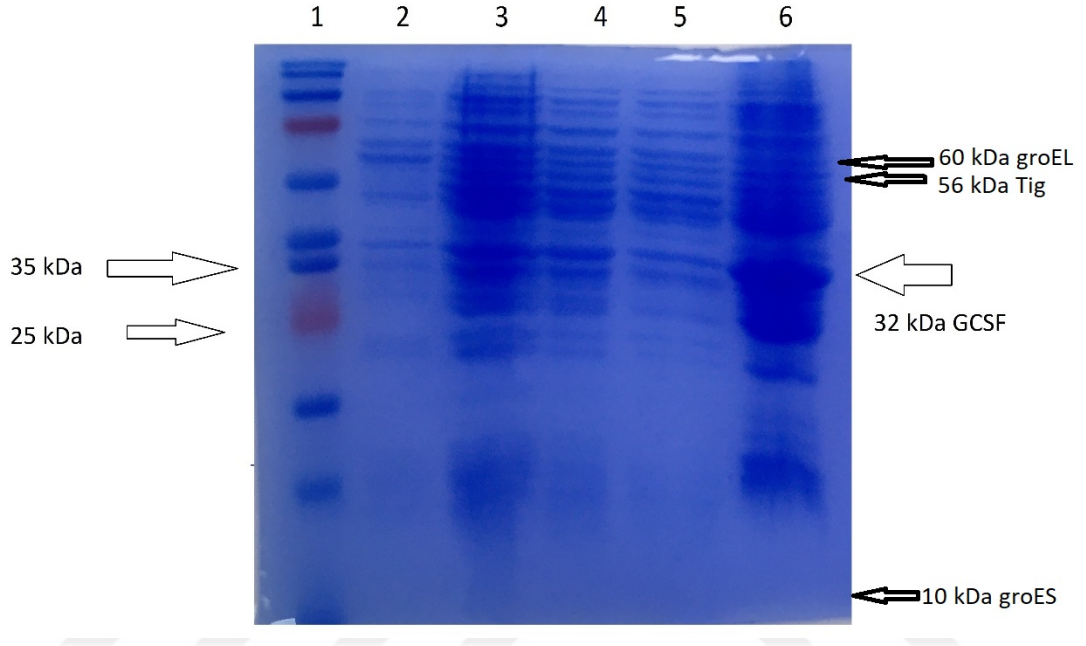
Şekil 4.1. GCSF'nin pG-KJE8 plazmidi ile koekspresyonu sonucu SDS-PAGE görüntüsü. DnaK-dnaJ-grpE ve groES-groEL şaperonların içeren pG-KJE8 Plazmidi ile koekspresyon sonucu SDS-PAGE jel görüntüsü. 1. Kuyucuk protein markör, 2. Kuyucuk İndükleme öncesi, 3. Kuyucuk indükleme sonrası, 4. Kuyucuk sonikasyon sonrası, 5. Kuyucuk ultrasantrifüj sonrası süpernatant, 6. Kuyucuk ultrasantrifüj sonrası pellet içermektedir.



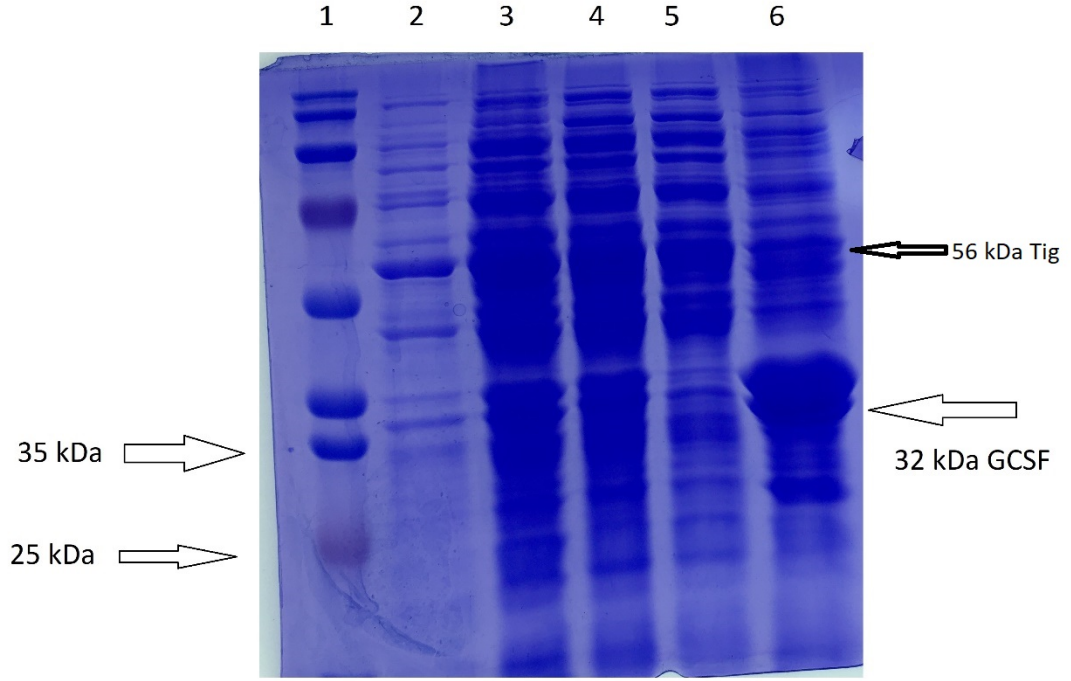
Şekil 4.2. GCSF'nin pGro7 plazmidi ile koekspresyonu sonucu SDS-PAGE görüntüsü. GroES-groEL şaperonlarını içeren pGro7 Plazmidi ile koekspresyon sonucu SDS-PAGE jel görüntüsü. 1. Kuyucuk protein markör, 2. Kuyucuk İndükleme öncesi, 3. Kuyucuk indükleme sonrası, 4. Kuyucuk sonikasyon sonrası, 5. Kuyucuk ultrasantrifüj sonrası süpernatant, 6. Kuyucuk ultrasantrifüj sonrası pellet içermektedir.



Şekil 4.3. GCSF'nin pKJE7 Plazmidi ile koekspresyonu sonucu SDS-PAGE görüntüsü. DnaK-dnaJ-grpE şaperonlarını içeren pKJE7 Plazmidi ile koekspresyon sonucu SDS-PAGE jel görüntüsü. 1. Kuyucuk protein markör, 2. Kuyucuk İndükleme öncesi, 3. Kuyucuk indükleme sonrası, 4. Kuyucuk sonikasyon sonrası, 5. Kuyucuk ultrasantrifüj sonrası süpernatant, 6. Kuyucuk ultrasantrifüj sonrası pellet içermektedir.

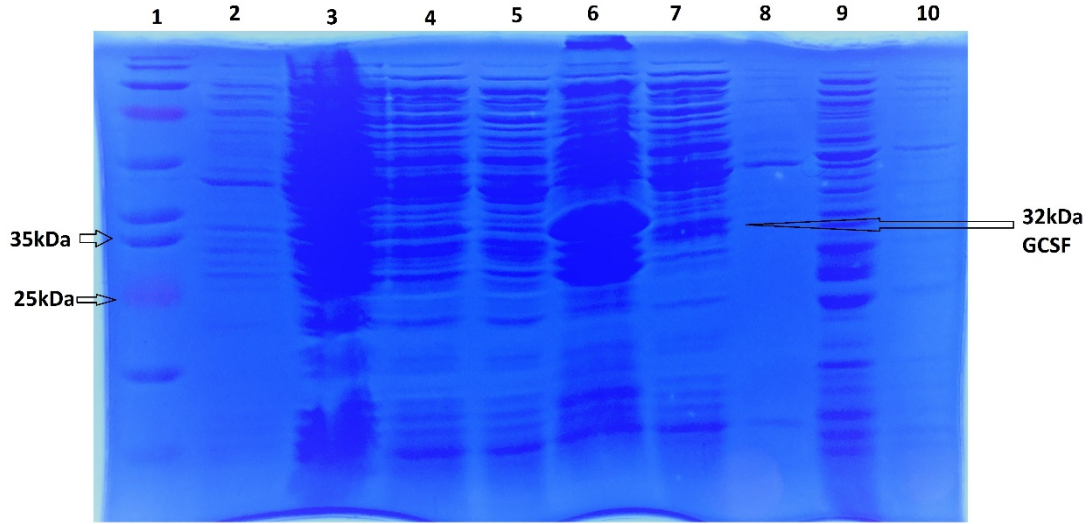


Şekil 4.4. GCSF'nin pG-Tf2 Plazmidi ile koekspresyonu sonucu SDS-PAGE görüntüsü. GroES-groEL-tig şaperonlarını içeren pG-Tf2 Plazmidi ile koekspresyon sonucu SDS-PAGE jel görüntüsü. 1. Kuyucuk protein markör, 2. Kuyucuk İndükleme öncesi, 3. Kuyucuk indükleme sonrası, 4. Kuyucuk sonikasyon sonrası, 5. Kuyucuk ultrasantrifüj sonrası süpernatant, 6. Kuyucuk ultrasantrifüj sonrası pellet içermektedir.



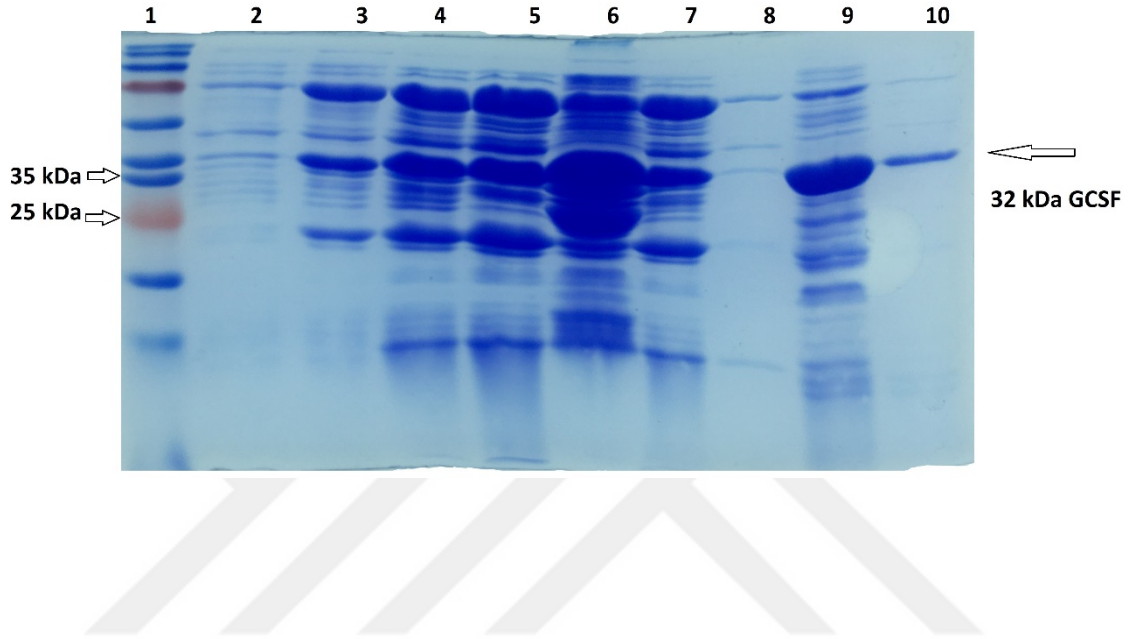
Şekil 4.5. GCSF'nin pTf16 Plazmidi ile koekspresyonu sonucu SDS-PAGE görüntüsü. tig şaperonunu içeren pTf16 Plazmidi ile koekspresyon sonucu SDS-PAGE jel görüntüsü. 1. Kuyucuk protein markör, 2. Kuyucuk İndükleme öncesi, 3. Kuyucuk indükleme sonrası, 4. Kuyucuk sonikasyon sonrası, 5. Kuyucuk ultrasantrifüj sonrası süpernatant, 6. Kuyucuk ultrasantrifüj sonrası pellet içermektedir.

Hedef ürünün şaperonsuz olarak *E. coli* hücrelerinde ekspresyonu sonucunda alınan örneklerle oluşturulan SDS-PAGE görüntüsü şekil 4.6.'da gösterilmiştir.



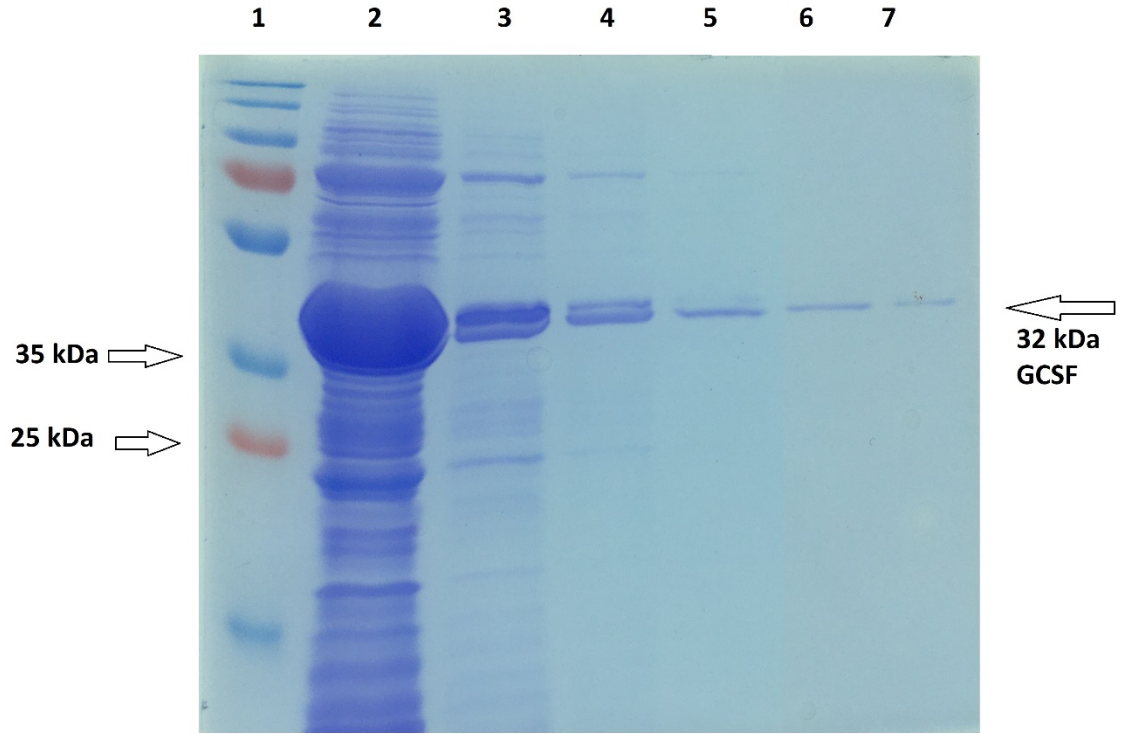
Şekil 4.6. GCSF'nin şaperon plazmit ile koekspresyonu olmadan TOLAIİİ füzyonu ile ekspresyonu. 1.Kuyucuk protein markör, 2. Kuyucuk indükleme öncesi TOLAIİİ-GCSF plazmidi içeren *E. coli* BL21 pLysE hücreleri, 3.Kuyucuk IPTG ile indükleme sonrası - GCSF plazmidi içeren *E. coli* BL21 pLysE hücreleri, 4. Kuyucuk Sonikasyon ve enzimatik hücre parçalama sonrası, 5. Kuyucuk ultrasantrifüj sonrası süpernatant, 6. Kuyucuk ultrasantrifüj sonrası pellet, 7. Kuyucuk affinite kromatografisi sırasında kolona tutulmayan moleküller, 8. Kuyucuk İmidazol içermeyen fosfat tamponu ile yıkama sonrası kolondan gelen moleküller, 9. Kuyucuk Kolona tutunduktan sonra imidazol içeren tampon ile ilk elüsyon, 10. Kuyucuk Kolona tutunduktan sonra imidazol içeren tampon ile ikinci elüsyon.

Hedef ürünün koekspresyon yöntemi ile PKJE7 plazmidi ve ekspresyon vektörünün *E. coli* hücrelerinde ekspresyonu sonucunda alınan örneklerle oluşturulan SDS-PAGE görüntüsü şekil 4.7.' de gösterilmiştir.



Şekil 4.7. GCSF'nin PKJE7 plazmidi ile koekspresyonunun büyük ölçekte üretimine ait SDS-PAGE görüntüsü. 1.Kuyucuk protein markör, 2. Kuyucuk indüklemeye öncesi TOLAIII-GCSF plazmidi içeren *E. coli* hücreleri, 3.Kuyucuk IPTG ile indüklemeye sonrası TOLAIII-GCSF plazmidi içeren *E. coli* hücreleri, 4. Kuyucuk Sonikasyon ve enzimatik hücre parçalama sonrası, 5. Kuyucuk ultrasantrifüj sonrası süpernatant, 6. Kuyucuk ultrasantrifüj sonrası pellet, 7. Kuyucuk affinite kromatografisi sırasında kolona tutulmayan moleküller, 8. Kuyucuk İmidazol içermeyen fosfat tamponu ile yıkama sonrası kolondan gelen moleküller, 9. Kuyucuk Kolona tutunduktan sonra imidazol içeren tampon ile ilk elüsyon, 10. Kuyucuk Kolona tutunduktan sonra imidazol içeren tampon ile ikinci elüsyon.

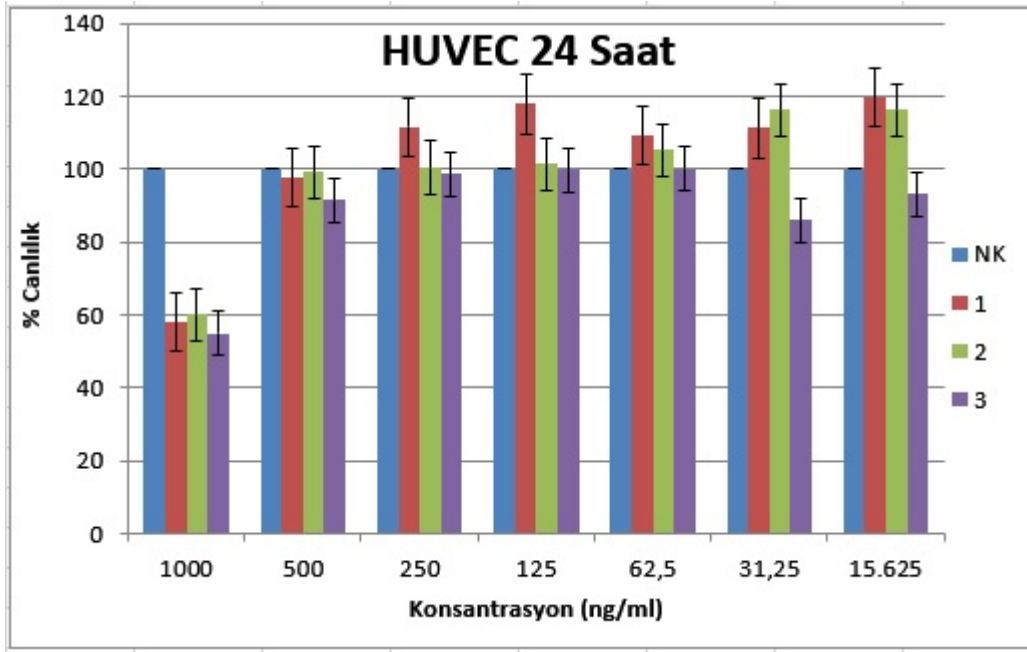
Protein konsantratörü yardımı ile istenmeyen proteinlerin boyutlarına göre fraksiyonlanması sonucu hedef ürünün saf olarak elde edilmesine dayalı yapılan çalışmaya ait SDS-PAGE görüntüsü Şekil 4.8.' de gösterilmiştir.



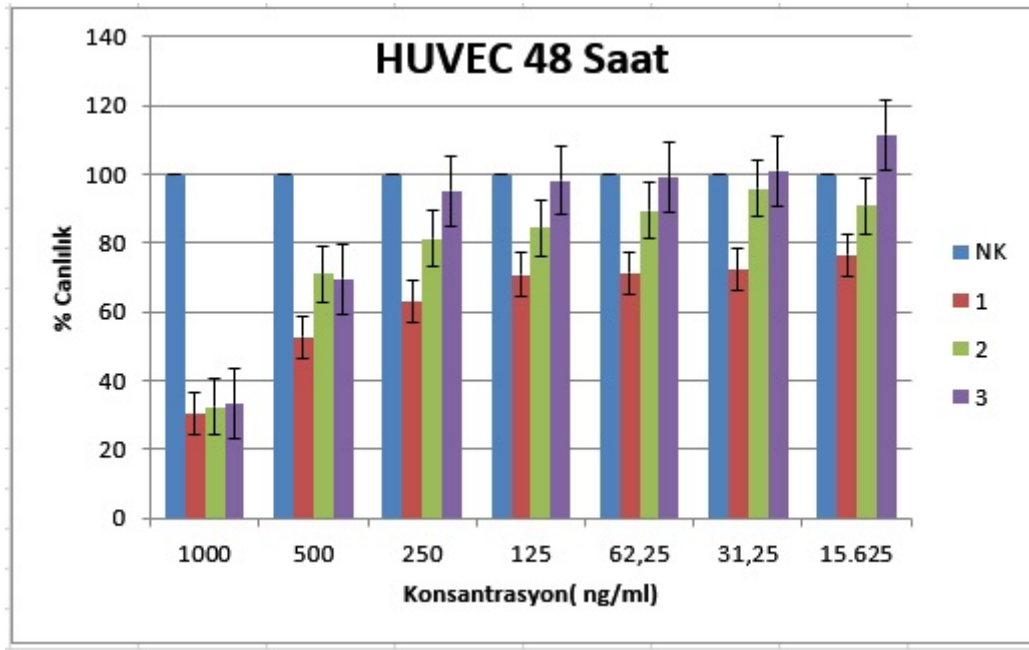
Şekil 4.8. GCSF'nin PKJE7 plazmidi ile koekspresyonu sonrası ek saflaştırma işlemlerine ait SDS-PAGE görüntüsü 1.Kuyucuk protein markör, 2. Kuyucuk Kolona tutunduktan sonra imidazol içeren tampon ile ilk elüsyon, 3. Kuyucuk 50 cutoff protein konsantratörü ile alta geçen proteinler, 4. .Kuyucuk 30 cutoff protein konsantratörü ile üstte kalan proteinler, 5,6 ve 7. Kuyucuklar diyaliz sonrası hücre kültürü öncesi saf GCSF.

4.2. Hücre Canlılık Testlerine Ait Bulgular

GCSF, rekombinant olarak çözülebilir formda üretilip saflaştırıldıktan sonra HUVEC hücre hattında hücrelerin canlılığı ve proliferasyonunu gözlemlemek adına hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır. GCSF'nin hücre canlılığına ve proliferasyonuna katkı sağlanması beklenmektedir. Bu çalışmalara ait değerler "Excel" programında % canlılığa ait sütun grafiği oluşturulmuştur. 24 ve 48 saat boyunca GCSF'ye maruz bırakılan HUVEC hücre kültürüne ait % canlılık verileri Şekil 4.9. ve Şekil 4.10.'da gösterilmiştir.



Şekil 4.9. HUVEC hücre hattında GCSF'nin 24 saat sonrası aktivite tayinine ait % Canlılık grafiği. 24 Saat sonu HUVEC hücre hattıyla yapılan çalışmada NK: Negatif kontrol, 1: 0.5 mg/mL 30 cutoff üstü saf protein, 2: 0.3 mg/ml Saf GCSF, 3: 1 mg/mL 50 cutoff altı saf proteinden ng/mL bazında seyreltilmiş protein.



Şekil 4.10. HUVEC hücre hattında GCSF'nin 48 saat sonrası aktivite tayinine ait % Canlılık grafiği. 48 saat sonunda HUVEC hücre hattıyla yapılan çalışmada NK: Negatif kontrol, 1: 0.5 mg/mL 30 cutoff üstü saf protein, 2: 0.3 mg/ml Saf GCSF, 3: 1 mg/mL 50 cutoff altı saf proteinden ng/mL bazında seyreltilmiş protein.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tez çalışmasının temelini daha önceki çalışmalarda inklüzyon cisimciği olarak agregat olan GCSF gibi çok kıymetli bir biyomolekülün çözülebilir formda üretilerek saflaştırılmasının ve aktivitesinin yapılması amacı oluşturmuştur. Farklı şaperonları ifade eden plazmitler ile yapılan koekspresyon sonucu 32 kDa boyutundaki GCSF'nin çözülebilir formda yani süpernatant kısmında olması gerekmektedir. Ultra santrifüj sonrası süpernatant kısmında bulunan doğru katlanmış proteinlerin saflaştırılması işlemi, refolding işlemlerine göre çok daha ekonomik, verimli ve kolaydır. Yapılan denemelerde bulgularda bulunan görüntülerden anlaşılabileceği üzere pG-KJE8, pGro7, pG-Tf2, pTf16 plazmitleri beklenen etkiyi göstermemiştir. Fakat pKJE7 plazmidi (Şekil 2.6.) ile yapılan koekspresyon sonucu GCSF'nin doğru şekilde çözülebilir formda ekspresyonun iyi bir verimle sağlanmış olduğu belirlenmiştir.

Hücre kültürü için proteinin saflığının çok yüksek olması gerektiğinden, histidince zengin olduğundan afinite kolona tutunan istenmeyen proteinlerin giderilmesi için 30 ve 50 Cutoff protein konsantratörleri kullanılmıştır. Bu sayede belirli boyut aralığındaki istenmeyen proteinler elimine edilerek safsızlık çok büyük oranda giderilmiştir. Ayrıca şaperon proteinlerin istenmeyen veya hücre kültüründe sitotoksik etki yapabilecek proteinlerin katlanmasına katkı sağlayacağı gerçeği de göz önüne alınarak saflığın büyük oranda sağlanması gerektiği gerçeği göz önüne alınmıştır.

Çalışmamızda rekombinant protein üretiminde oldukça sık kullanılan *E. coli* bakterisi ile insan granülosit koloni uyarıcı faktörün (GCSF) çözülür halde üretilerek oldukça kıymetli olan bu biyomolekülün üretim maliyeti, zorluğu ve üretim süresinin azaltılması yönünde çalışmalar yapılmıştır.

Şekil 4.6.'da görüldüğü üzere koekspresyon olmadan *E. coli* BL21 pLysE hücreleri ile tek başına yeterli ve doğru katlanmanın olmadığı belirlenmiştir. Bu şekilde üretimi yapılan GCSF proteininin inklüzyon cisimciği olarak agregasyona uğradığı ve

işlevselliğini ve verimini kaybettiği bilinmektedir (Vanz ve ark., 2008). Şekilde 6 numaralı kuyucukta ekspresyonu sağlanan büyük miktarda GCSF'nin agregasyona uğrayarak pellet olarak çöktüğü görülmektedir.

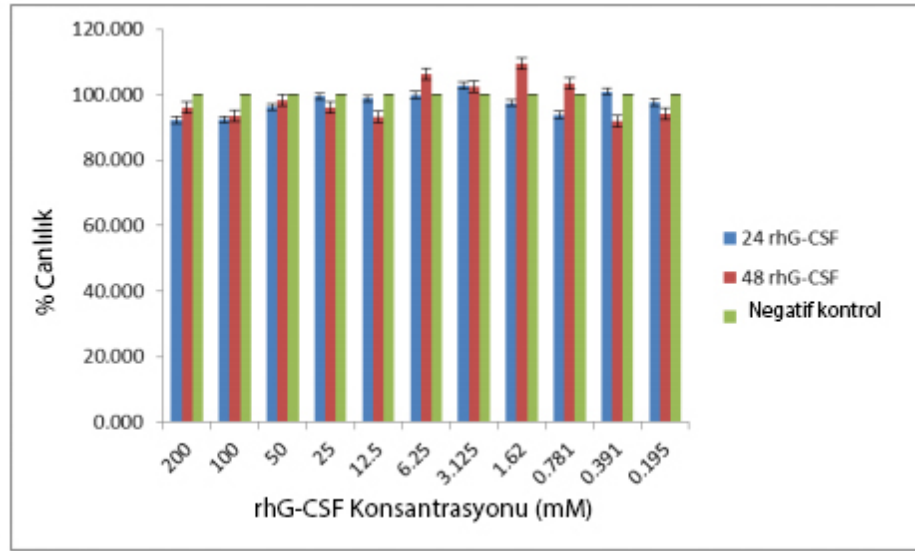
Şekil 4.6.' da 6 numaralı kuyucukta pellet olarak çöken GCSF, PKJE7 şaperon sistemi ile koekspresyonu sonucunda sağladığı katlama verimliliği ile şekil 4.7' de 9 numaralı kuyucukta büyük oranda inklüzyondan kurtarılmıştır. Böylece önceki çalışmalarda kullanılan ve büyük oranda verim kaybıyla sonuçlanan ve vakit kaybettiren refolding işlemlerine ihtiyaç duymadan GCSF çözülebilir formda üretilmiştir. Saf ve işlevsel olarak elde edilen GCSF, hücre kültürü çalışmaları için saflaştırma oranının artırılmasına ve toksik etki yapabilecek bileşenlerden arındırılması amacıyla ekstra saflaştırma işlemlerine tabii tutulmuştur. Hem protein konsantrasyonunu azaltmak hem de istenmeyen moleküllerin eliminasyonunu sağlamak amaçlı protein konsantratörleri kullanılmış ve belirli büyüklük aralığındaki moleküller uzaklaştırılmıştır (Şekil 4.8). Hücre kültürü için yapılan protein üretimi sırasında 4 adet 600 mL LB besiyerinde büyütülen hücrelerden saflaştırma sonunda 100 µl Ni-NTA Agaroza tutunup saflaştırılan protein konsantrasyonu 3.91 mg/mL'dir. Ek saflaştırma süreçleri sonrasında elde edilen saf GCSF miktarı yaklaşık 1.5 mg/mL'dir.

HUVEC hücre hattı ile yapılan yüzde canlılık testinde şekil 4.9' da görüldüğü üzere 24. Saat sonunda 1 numara ile gösterilen 0.5 mg/mL saf GCSF, negatif kontrole (NK) karşı 250 ng/mL' den daha düşük seviyelerde daha etkili bir sonuç göstermiştir. Fakat 1000 ve 500 ng/mL konsantrasyonunda beklenen etkiyi sunmamıştır. Öte yandan 0.3 mg/mL saf GCSF yine düşük konsantrasyonda hücre hattı canlılığını arttıran bir etki göstermiştir.

HUVEC hücre hattı ile yapılan yüzde canlılık testinde ise şekil 4.10' da görüldüğü üzere 48. saat sonunda 1 numara ile gösterilen 0.5 mg saf GCSF ve 2 numara ile gösterilen 0.3 mg/mL Saf GCSF, negatif kontrole (NK) karşı düşük bir etki göstermiştir. Diğer yandan 3 numara ile gösterilen 1 mg/mL 50 cutoff altı protein, negatif kontrol ve diğer konsantrasyonlara karşı az da olsa etki göstermeye devam etmiştir.

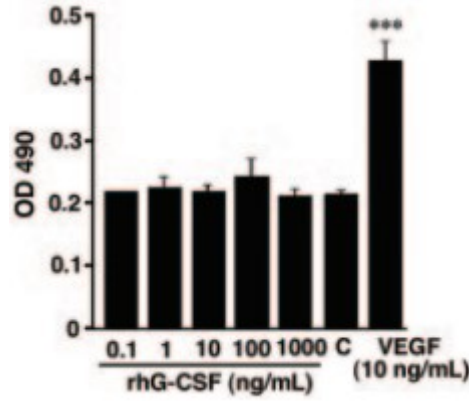
Bozkurt ve ark., (2019) tarafından yapılan çalışmada, rekombinant GCSF refolding işlemleri ile elde edilerek HUVEC hücre hattında MTT ile % canlılık testi yapılmıştır.

Yapılan çalışmada 200 mM, 100 mM, 50 mM, 25 mM, 12.5 mM, 6.25 mM, 3.125 mM, 1.62 mM, 0.781 mM, 0.391 mM ve 0.195 mM konsantrasyonlarında GCSF uygulanmış, 25 mM, 6.25 mM ve 1.62 mM konsantrasyonundaki GCSF hücre canlılığına ve proliferasyonuna katkıda bulunmuştur (Şekil 5.1.). Fakat şaparon sistemler ile koekspresyon şeklinde yaptığımız çalışma sonucu elde edilen GCSF'nin daha etkili olduğu saptanmıştır.



Şekil 5.1. Farklı rhG-CSF konsantrasyonlarının HUVEC hücre hattında 24 ve 48 saat sonu % Canlılık analizi (Bozkurt, 2019-Modifiye edilmiştir).

Lee ve ark., (2005) tarafından yapılan çalışmada, 0.1 ng/mL, 1 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL, 100 ng/mL rh-GCSF, negatif kontrol (C ile gösterilmiş), ve 10 ng/mL VEGF ile OD 490 nm dalga boyunda HUVEC hücre hattı ile proliferasyon testi (Şekil 5.2.). Bu çalışmada ticari rhG-CSF (Lenogratisim), Chugai Pharmaceutical Co,Ltd. (Tokyo)' den temin edilmiş, fakat HUVEC hücre hattında hücre proliferasyonuna negatif kontrol ile benzer bir etki gösterirken VEGF oldukça büyük bir etki göstermiştir.



Şekil 5.2. rhG-CSF ve VEGF'nin HUVEC proliferasyon analizi (Lee ve ark., 2005).

Höglund, (1998) tarafından yapılan çalışmada lenograstim ve filgrastimin aktivite karşılaştırmasını yapmış ve glikolizasyondan dolayı lenograstimin reseptörüne olan ilgisinin artmış olabileceği konusuna değinmiştir. Çalışmada ayrıca dolaşım yönünde ve yarılanma ömrü konusunda belirgin bir fark saptanmadığı belirlenmiştir.

Bu tez kapsamında katma değeri yüksek olan ve klinikte oldukça yaygın olarak kullanılan Granülosit koloni uyarıcı faktör (GCSF)'nin koekspresyon yöntemi ile çözünür formda, yüksek etkinliğe ve verime sahip üretimi yönünde çalışmalar yapılmıştır. GCSF gibi kıymetli terapötik ürünlere olan ihtiyaç günden güne artmaktadır. Bu ihtiyacı karşılamak adına farklı çalışmalar yürütülmektedir. Bu tez çalışmasının da artan talebin karşılanması noktasında katkı sunacağı ve ilham vereceği öngörülmektedir. Sonuç olarak çözülür formda işlevsel ve saf GCSF, çeşitli klinik çalışmalarda kullanılmak için gelecek vadetmektedir. Dolayısıyla rekombinant insan koloni uyarıcı faktörün (GCSF) çözülebilir formda ve saf olarak üretilmesi, ülkemiz adına yerli ve milli teknoloji hamlesinin gerçekleştirilmesi noktasında biyoteknoloji alanında büyük önem arz etmektedir.

6. KAYNAKÇA

- Aktaş, F., 1996. Hematopoetik büyüme faktörleri ve infeksiyon hastalıklarında kullanımı. *Flora*, 1996 2:71-76.
- Anderluh, G., Gökçe, I., ve Lakey, J. H., 2003. Expression of proteins using the third domain of the Escherichia coli periplasmic-protein TolA as a fusion partner. *Protein Expression and Purification*, 28(1), ss. 173–181. doi: 10.1016/S1046-5928(02)00681-2.
- Anonim a, 2020. Biyoteknoloji nedir? https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/101548/mod_resource/content/0/GDM314_FÖ_01_Biyoteknoloji_nedir.pdf (Erişim: 10 Kasım 2020).
- Anonim b, 2020. Hematopoiesis process in development and adult stage. <https://www.gafacom.website/2020/07/hematopoiesis-process-in-development.html> (Erişim: 10 Kasım 2020).
- Anonim c, 2020. Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF) Use in Adult Patients, Pharmacy / Medical policy – 5.01.551. <https://www.premera.com/medicalpolicies/5.01.551.pdf>.
- Anonim d, 2019. The Protein Man’s Blog | A Discussion of Protein Research Use of Chaperones in Recombinant Protein Expression. <https://info.gbiosciences.com/blog/use-of-chaperones-in-recombinant-protein-expression> (Erişim: 10 Kasım 2020).
- Anonim e, 2020. pKJE7 Chaperone Plasmid. <https://www.lifescience-market.com/plasmid-c-94/pkje7-plasmid-p-63480.html> (Erişim: 10 Kasım 2020).
- Anonim f, 2020. Chaperone protein DnaK. <https://www.uniprot.org/uniprot/P0A6Y8> (Erişim: 20 Kasım 2020).
- Anonim g, 2020. Chaperone protein DnaJ. <https://www.uniprot.org/uniprot/P08622> (Erişim: 20 Kasım 2020).
- Anonim h, 2020. Chaperone Protein GrpE. <https://www.uniprot.org/uniprot/C4ZYN1> (Erişim: 20 Kasım 2020).
- Anonim j, 2018. Takara chaperone plasmid manuals. https://www.takara.co.kr/file/manual/pdf/9120-9125_e.v1810Da.pdf (Erişim: 20 Kasım 2020).

- Boneberg, E. M., ve Hartung, T., 2002. Molecular aspects of anti-inflammatory action of G-CSF. *Inflammation Research*, 51(3), 119–128.
doi: 10.1007/PL00000283.
- Bozkurt, Y., 2018. Kan kanseri tedavisinde sıklıkla kullanılan insan hematopoetik büyüme faktörlerinden g-csf ve gm-csf'ün rekombinant olarak üretilmesi saflaştırılması ve karakterizasyonu. (Y.Lisans Tezi), Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Biyomühendislik A.B.D., 20–24.
- Bozkurt, Y., 2019. Recombinant Human G-CSF Production as a Protein Based Drug Candidate for Hematology and Oncology. *International Journal of Chemistry and Technology*, 3(2).
doi: 10.32571/ijct.600180.
- Burgess, R. R., 2009. Chapter 17 Refolding Solubilized Inclusion Body Proteins. 259–282. doi: 10.1016/S0076-6879(09)63017-2.
- Crawford, C. A., 1983 *Principles of biotechnology*, Trends in Biotechnology.
doi: 10.1016/0167-7799(83)90025-2.
- Dale, D. C., Lies, W. C., Summer, W. R., Nelson, S., 1995 Review: Granulocyte Colony-Stimulating Factor--Role and Relationships in Infectious Diseases. *Journal of Infectious Diseases*, 172(4), 1061–1075.
doi: 10.1093/infdis/172.4.1061.
- Datar, R. V., Cartwright, T., ve Rosen, C.-G., 1993 Process Economics of Animal Cell and Bacterial Fermentations: A Case Study Analysis of Tissue Plasminogen Activator. *Bio/Technology*, 11(3), 349–357.
doi: 10.1038/nbt0393-349.
- Glick, R. B., Pasternak, J. J., Pattern, L. C., 2009. *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA (4th Edition)*. ASM Press, 850 p, Washington, DC , USA.
- Gül, Ü. D., 2014. Sağlık Alanında Biyoteknolojik Uygulamalar: Kırmızı Biyoteknoloji *Biotechnological Applications in the Field of Health: Red Biotechnology*. Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 2330, 2148–2330.
- Hanahan, D., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4).
doi: 10.1016/S0022-2836(83)80284-8.
- Hartley, D. L., ve Kane, J. F., (1988) Properties of inclusion bodies from recombinant *Escherichia coli*, *Biochemical Society Transactions*, 16(2), 101–102.
doi: 10.1042/bst0160101.

- Höglund, M., 1998. Glycosylated and non-glycosylated recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF)—what is the difference?, *Medical Oncology*, 15(4), ss. 229–233.
doi: 10.1007/BF02787205.
- Hu, W. S., 2017. *Engineering Principles in Biotechnology*. Wiley, 504 p, Minneapolis, USA.
- Jelkmann, W., 2007. Erythropoietin after a century of research: younger than ever. *European Journal of Haematology*, 78(3), 183–205.
doi: 10.1111/j.1600-0609.2007.00818.x.
- Khan, F. A., 2016. *Biotechnology Fundamentals*. CRC PressTaylor & Francis Group, 709 p, London, England.
- Lee, M., Aoki, M., Kondo, T., Kobayashi, K., Okumura, K., Komori, K., Murohara, T., 2005. Therapeutic angiogenesis with intramuscular injection of low-dose recombinant granulocyte-colony stimulating factor. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 25(12), 2535–2541.
doi: 10.1161/01.ATV.0000190609.28293.17.
- de Marco, A., Deuerling, E., Mogk, A., Tomoyasu, T., Bukau, B., 2007. Chaperone-based procedure to increase yields of soluble recombinant proteins produced in *E. coli*. *BMC Biotechnology*, 7, ss. 1–9.
doi: 10.1186/1472-6750-7-32.
- Mehta, H. M., Malandra, M., and Corey, S. J., 2015. G-CSF and GM-CSF in Neutropenia. *The Journal of Immunology*, 195(4), 1341–1349.
doi: 10.4049/jimmunol.1500861.
- Metcalf, D., 2008. Hematopoietic cytokines. *Blood*, 111(2), 485–491.
doi: 10.1182/blood-2007-03-079681.
- Pham, P. V., 2018. *Medical biotechnology: Techniques and applications*. Omics Technologies and Bio-engineering, 1, 462–463.
doi: 10.1016/B978-0-12-804659-3.00019-1.
- Rudolph, R., and Lilie, H., 1996. In vitro folding of inclusion body proteins. *The FASEB Journal*, 10(1), s. 49–56.
doi: 10.1096/fasebj.10.1.8566547.
- Rutella, S., Zavala, F., Danese, S., Kared, H., Leone, G., 2005. Granulocyte Colony-Stimulating Factor: A Novel Mediator of T Cell Tolerance. *The Journal of Immunology*, 175(11), 7085–7091.
doi: 10.4049/jimmunol.175.11.7085.

- Scheich, C., Kümmel, D., Soumailakakis, D., Heinemann, U., Büsow, K., 2007. Vectors for co-expression of an unrestricted number of proteins. *Nucleic Acids Research*, 35(6), e43–e43. doi: 10.1093/nar/gkm067.
- Schneider, C., Aulock, V. S., Zedler, S., Schinkel, C., Hartung, T., Faist, E., 2004. Perioperative Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor (Filgrastim) Treatment Prevents Immunoinflammatory Dysfunction Associated With Major Surgery. *Annals of Surgery*, 239(1), 75–81. doi: 10.1097/01.sla.0000103062.21049.82
- Schrödel, A., de Marco, A., 2015. Characterization of the aggregates formed during recombinant protein expression in bacteria. *BMC Biochemistry*, (6:10). doi: 10.1186/1471-2091-6-10.
- Slukvin, I. I., 2013. Hematopoietic specification from human pluripotent stem cells: current advances and challenges toward de novo generation of hematopoietic stem cells. *Blood*, 122(25), 4035–4046. doi: 10.1182/blood-2013-07-474825.
- Thomas, J. G., Ayling, A., and Baneyx, F., 1997. Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from *E. coli*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 66(3), 197–238. doi: 10.1007/BF02785589.
- Upadhyay, A. K., Singh, A., Mukherjee, K. J., Panda, A. K., 2014. Refolding and purification of recombinant L-asparaginase from inclusion bodies of *E. coli* into active tetrameric protein. *Frontiers in Microbiology*, 5(SEP), 1–10. doi: 10.3389/fmicb.2014.00486.
- Vallejo, L, F., R. U. 2004. Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial IB proteins. *Microbial Cell Factories*, (3(1):11). doi: 10.1186/1475-2859-3-11.
- Vanz, LS A., Renard, G., Palma, S, M., Chies, M, J., Dalmora, L, S., Santos, S, D., 2008. Human granulocyte colony stimulating factor (hG-CSF): Cloning, overexpression, purification and characterization. *Microbial Cell Factories*, 7, 1–12. doi: 10.1186/1475-2859-7-13.
- Wall, J. G., and Plückthun, A., 1995 Effects of overexpressing folding modulators on the in vivo folding of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 6(5), 507–516. doi: 10.1016/0958-1669(95)80084-0.
- Wier, M. P., Sparks, J., Chaplin, A. M., 1987. Micropreparative purification of recombinant human interleukin-2. *Journal of Chromatography A*, 396, 209–215. doi: 10.1016/S0021-9673(01)94058-0.

Wingfield, P., Benedict, R., Turcatti, G., Allet, B., Mermod, J. J., DeLamarter, J., Simona, M. G., Rose, K., 1988. Characterization of recombinant-derived granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF). *Biochemical Journal*, 256(1), 213–218.
doi: 10.1042/bj2560213.



7. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler :

Adı – Soyadı :	Mustafa SONGUR
----------------	----------------

Öğrenim Bilgileri :

Lisans :	Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Biyomühendislik Bölümü
----------	--

Aldığı Burslar ve Projeleri :

TÜBİTAK 2209-B Sanayiye Yönelik Lisans Araştırma Projeleri Destekleme Programı	Anti-Tümör Ajanı Olarak Kullanmak Amaçlı J2-C2 Proteininin Rekombinant Olarak Üretilmesi
2247-C Stajyer Araştırmacı Burs Programı (STAR)	Biyoteknoloji Laboratuvarı bünyesinde kurulacak olan Moleküler Tanı Laboratuvarı alt yapısının oluşturulması ve tek adımlı RTPCR tabanlı Covid-19 tanı kiti geliştirilmesi